

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Anatomie
Lehrstuhl für Anatomie und Entwicklungsbiologie

Zellpolaritäten und Achsenentwicklung beim präimplantativen Säugerembryo:
Immunhistochemische Untersuchungen am Kaninchenembryo und
entwicklungsbiologische Diskussion

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Timm Littwin
aus Gelsenkirchen
2008

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. rer. nat. K.-H. Jöckel
1. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer.nat. H.-W. Denker
2. Gutachterin: Frau Priv.-Doz. Dr. med. P. Wimberger
Tag der mündlichen Prüfung: 11. August 2008

1. Einleitung	5
1.1 Bedeutung des Themas	5
1.2 Innen-Außen-Hypothese	6
1.3 Segregationshypothese	7
1.4 Vorbefunde zur Leptinverteilung im präimplantativen Säugerembryo	8
1.5 Ziele dieser Arbeit	9
2. Material und Methoden	10
2.1 Embryonengewinnung	10
2.2 Immunhistochemie am Ganzpräparat („Whole-Mount-IHC“)	11
2.2.1 Präparat-Vorbereitung	11
2.2.2 Immunhistochemie	12
2.3 Protokoll für die Aktin-Phalloidin-TRITC-Färbungen am Ganzpräparat	13
2.4 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	13
2.5 Einbettung der Embryonen	14
2.6 Immunhistochemie am Semidünnschnitt	15
2.6.1 Fluoreszenzmikroskopische Nachweise	15
2.6.2 Alternativverfahren	16
2.7 Protokoll für die Aktin-Phalloidin-TRITC-Färbungen am Semidünnschnitt ..	17
2.8 Auswertung der Semidünnschnitte am CLSM und 3D-Rekonstruktion	17
3. Ergebnisse	18
3.1 Ergebnisse der Vorversuche zur immunhistochemischen Methodik	18
3.2 Auswertung der Ganzpräparate mittels CLSM	18
3.2.1 Leptindarstellung an frühen Morulae (56 Stunden p.c.)	18
3.2.2 Leptindarstellung an späten Morulae (69 Stunden p.c.)	21
3.2.3 Aktin-Phalloidin-TRITC-Markierungen	21
3.2.4 Zytokeratindarstellungen	23
3.3 Auswertung der Semidünnschnitte/Realschnitte	23
3.3.1 Leptindarstellung an frühen Morulae (54 Stunden p.c.)	24
3.3.2 Leptindarstellung an späten Morulae und Blastozysten (69 bis 80 Stunden p.c.)	26
3.3.3 Zytokeratindarstellungen	27
4. Diskussion	28
4.1 Penetrationsartefakte bei Ganzpräparaten	29
4.1.1 Aktin	30
4.1.2 Intermediärfilamente	31
4.2 Artefakte bei CLSM-Untersuchungen	32
4.3 Technische Problematik der Vorbereitung der Embryonen für die Whole- Mount-Versuche	34

4.4 Allgemeines zu Leptin und seiner Rolle im Reproduktionsgeschehen.....	36
4.5 Leptin in präimplantativen Embryonen.....	37
4.6 Bedeutung der embryonalen Hüllen	41
4.7 Herkunft des nachgewiesenen Leptins	43
4.8 Literaturdaten zu Asymmetrien als Vorstufen der Achsenbildung in frühesten Entwicklungsstadien beim Säugetier	45
4.8.1 Asymmetrisches Färbeverhalten nach Quecksilber-Bromphenolblau-Färbung.....	45
4.8.2 Befunde zu molekularen Ungleichverteilungen bei präimplantativen Embryonen.....	46
4.9 Blastomerendetermination	48
4.10 Polarisationshypothese.....	52
4.11 Frühembryonale Achsenbildungsprozesse	53
4.11.1 Embryonal-Abembryonal-Achse	53
4.11.2 Animal-vegetative-Achse	54
4.11.3 Kranio-Kaudal-Achse/Anterior-Posterior-Achse	55
4.11.4 Persistenz der A-V-Achse	55
4.11.5 Lagebeziehung A-V – Emb-Ab-Achse.....	57
4.12 Der Spermieeintrittspunkt	60
4.13 Synopsis der gegenwärtigen Positionen verschiedener Autoren zu Trophoblast-/Embryoblastdetermination und Achsenbildung beim Säugetier...	62
4.14 Bedeutung der hier demonstrierten Ergebnisse für Blastomerenpotenz und Stammzellpotenz	63
4.15 Bedeutung der hier demonstrierten Ergebnisse für In-vitro-Fertilisation und Präimplantationsdiagnostik.....	65
4.16 Bedeutung der hier demonstrierten Ergebnisse für die Diskussion um Zeitpunkt und Mechanismus der Etablierung der Körperachsen und die Bedeutung von A-V-und Emb-Ab-Achse in diesem Zusammenhang	67
5. Zusammenfassung.....	70
6. Literaturverzeichnis	71
7. Anhang	79
7.1 Abbildungen.....	79
7.2 Abkürzungsverzeichnis	100
7.3 Chemikalienverzeichnis	100
7.4 Danksagung.....	102
8. Lebenslauf	103

1. Einleitung

1.1 Bedeutung des Themas

Die Entwicklung des menschlichen Individuums von der Zygote zum hochdifferenzierten Organismus ist ein komplexer Prozess. Schon die allerersten Zellteilungen auf diesem Weg bergen viele Fragen in sich, die im Licht neuer Forschungsergebnisse der letzten Dekade gegenwärtig kontrovers diskutiert werden. Die entbrannte Diskussion kreist vereinfacht gesagt um folgende Fragen:

1. Welche Mechanismen liegen der Determination der ersten zwei distinkten Zellarten des Säugetierembryos (Trophoblast, Innere Zellmasse = Embryoblast) zu Grunde?
2. Wann und wie entstehen die Achsen des Embryos bzw. damit auch der Grund-Bauplan („basic body plan“) des Individuums?

Dieser, von den führenden Embryologen unserer Zeit geführte, Disput ist vor allem auch methodologisch und wissenschaftstheoretisch interessant, weil zumindest die zweite der genannten Fragen bis vor etwa 15 Jahren von einem Großteil der Embryologen für beantwortet gehalten wurde. Unter z.T. großer Überraschung hatte aber in jüngster Zeit die Fachwelt eine Reihe verschiedenartiger neuer experimenteller Befunde zur Kenntnis zu nehmen, die in der Folge von mehreren Arbeitsgruppen überprüft und vertiefend bearbeitet wurden, wobei, z.T. abhängig vom gewählten experimentellen Ansatz, widersprüchliche Ergebnisse erzielt wurden (Gardner 2006a; Hiiragi und Solter 2004; Zernicka-Goetz 2004). Im Laufe einiger Jahre entwickelten sie neue, die bestehenden erweiternde, Theorien zur Beantwortung der oben genannten Fragen. Zudem ergaben sich in den letzten Jahren Fragen aus der klinischen Anwendung (z.B. im Bereich der In-vitro-Fertilisation oder der Präimplantationsdiagnostik, die teilweise nur durch embryologisch-experimentelle Ansätze zu beantworten sind. Hier sind beispielsweise die Frage nach dem Potenzstatus embryonaler Stammzellen oder die Zulässigkeit und Optimierung reproduktionsmedizinischer Eingriffe wie der In-vitro-Fertilisation und der Präimplantationsdiagnostik zu nennen. Ein erster bedeutender Differenzierungsprozess in der präimplantativen Säugerentwicklung ist die Bildung der Blastozyste unter Aufteilung der zuvor scheinbar homogenen Zellpopulation der Morula in Embryoblast (= Innere Zellmasse, = ICM) und Trophoblast (früher Trophoblast = Trophoektoderm, TE). Schon seit den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts haben sich verschiedene Arbeitsgruppen (Dalcq 1957; Seidel 1952; Tarkowski und Wroblewska 1967) mit diesem Phänomen befasst. Gründend auf einem Fundus experimenteller Befunde aus Isolations- und Reaggregationsversuchen (die in der Diskussion noch teilweise erläutert werden)

entwickelten sich zunächst zwei kontroverse Theorien zur Entstehung dieser beiden Zelllinien.

Die Zygote, das Verschmelzungsprodukt aus Eizelle und Spermium, ist beim Säugetier nach der Vorstellung, die die letzten etwa 30 Jahre dominierte, eine Kugel ohne jede Achse. Auch durch die Furchungsteilungen soll sich nach dieser Vorstellung zunächst keinerlei Verschiedenheit der Zellen ergeben. Dennoch kann man im Blastozystenstadium Embryoblast und Trophoblast voneinander unterscheiden. Die Blastozyste besitzt auch bereits eine Achse, da der Embryoblast exzentrisch liegt: die Embryonal-Abembryonal-Achse, die der Vorläufer der späteren Dorso-Ventral-Achse ist. Der Trophoblast verfügt über den Charakter eines transportierenden Epithels (z.B. unter Bildung von Zell-Zell-Kontakten; Fleming 1992), dessen Eigenschaften für die Bildung der Blastozystenhöhle sowie später für die Adhäsion an das Uterusepithel und die Invasion ins Endometrium und die anschließende Plazentation von Bedeutung sind. Beim Trophoblasten werden nach der Ausbildung der Blastozystenhöhle zwei Anteile unterschieden: zum einen der dem Embryoblasten unmittelbar aufliegende, sogenannte polare oder Embryonalpol-Trophoblast und der diesem gegenüberliegende murale oder abembryonale Trophoblast. Die ICM hingegen stellt sich zunächst als undifferenzierter Zellhaufen dar, aus dem sich dann einerseits das extraembryonale Endoderm, andererseits aber auch die drei embryonalen Keimblätter entwickeln (Fleming 1987). Es stellt sich also zunächst die Frage, wann und wieso einige Blastomeren einer Morula zu Embryoblast, unmittelbar daneben liegende zu Trophoblast werden.

1.2 Innen-Außen-Hypothese

Die sogenannte Innen-Außen-Hypothese (s. Abb. 1) führt die Entstehung dieser zwei Zelllinien auf die räumliche Anordnung der Blastomeren zurück. Wenn im Rahmen der Furchungsteilungen die Blastomerenzahl steigt, kann dies (die Bildung einer Höhle bleibt zunächst aus) zwangsläufig nur dazu führen, dass einige der Blastomeren in eine „Innenposition“ geraten und den Kontakt zum umgebenden perivitellinen Spalt (s. Abb. 4) und zur Zona pellucida verlieren und rundum nur von anderen Blastomeren umgeben sind (Tarkowski und Wroblewska 1967), diskutiert bei Denker (1976). Ein Mechanismus, über dessen Natur die Theorie selbst keinen Aufschluss gibt, soll dann dazu führen, dass durch die Position der Zellen, bei den innen liegenden Blastomeren durch den Verlust jeglichen Kontakts der Blastomerenoberfläche mit dem perivitellinen Spalt bzw. der Zona pellucida, eine unterschiedliche Differenzierung der inneren gegenüber den äußeren Zellen stattfindet.

Eine Variante der Innen-Außen-Hypothese, die 1981 von Johnson (Johnson und Ziomek 1981) entwickelte Polarisationshypothese, geht von derselben Grundannahme aus, ergänzt sie aber durch die Idee, dass der Entwicklung einer apiko-basalen (epitheltypischen) Zellpolarität in den außen liegenden präsumptiven Trophoblastzellen zellbiologisch gesehen die Hauptbedeutung bei diesem Prozess zukommt. Außerdem spielen eine asymmetrische Zellteilung der Blastomeren eine Rolle bei der Bildung der zwei ungleichen Zelllinien (genauer s. Diskussionsabschnitt zur Determination).

1.3 Segregationshypothese

Die sogenannte Segregationshypothese (Segregation bedeutet soviel wie "Aufspaltung") geht hingegen davon aus, dass schon in der Eizelle und/oder der Zygote morphogenetisch relevante zytoplasmatische Faktoren enthalten und polar verteilt sind (s. Abb.1). Im Rahmen der Furchungsteilungen werden diese dann inäqual an die Tochterblastomeren weitergegeben. Der Anteil einer Zelle an diesen Faktoren, nicht aber die Position der Zelle, entscheidet dann über ihre nachfolgende Differenzierung zu Embryoblast oder Trophoblast. Bei diesen Faktoren könnte es sich sowohl um kleinere Moleküle wie Transkriptionsfaktoren, aber auch Zellorganellen wie Mitochondrien oder auch Membrandomänen wie die apikale Plasmamembrandomäne mit ihrem Mikrovillibus handeln. Frühe Formulierungen dieser These finden sich bereits bei Dalcq (1957) und Seidel (1952, 1960). Die Segregationshypothese beim Säugetier findet Anlehnung in den für Nicht-Säugetiere dokumentierten Prozessen. Die determinierende Rolle einzelner Zytoplasmadomänen oder Zellen, etwa bei Amphibien in Form des Spemannschen Organisators (Spemann und Mangold 1924), ist hier gut belegt.

Die Frage nach den frühembryonalen Prozessen die bei verschiedenen Spezies der Bildung von Zelllinien und den frühembryonalen Achsen zu Grunde liegen ist vielfach diskutiert worden. Ein Review über Achsenbildung bei verschiedenen Spezies im Besonderen bei Nicht-Säugetern gibt z.B. Eyal-Giladi (1997). Ein radiärsymmetrisch angelegter Gradient (Abb. 2 b) würde nur eine Ungleichverteilung zwischen innen und außen bedingen, nicht aber eine Achse vorgeben. Ein exzentrisches Maximum des Gradienten (Abb. 1, 2a) aber gäbe eine Achse vor, an der sich im gezeigten Beispiel die Embryonal-Abembryonal-Achse orientiert. Allerdings ergibt sich hierbei das Problem, dass sich die maximale Faktorkonzentration im Blastozystenstadium in jenen Trophoblastzellen wiederfindet, die dem Embryoblasten unmittelbar aufliegen (der sog. Rauberschen Deckschicht), obgleich der im Bild mit dem roten Farbsymbol angedeutete Faktor doch die Lage des Embryoblasten determinieren soll. Die näherliegende Unterstellung wäre ja, dass die maximale Faktorkonzentration dann auch im Embryoblasten liegen sollte. Die

Lösung des Problems könnte entweder in einem radiärsymmetrischen Gradienten mit exzentrischem Mittelpunkt in der späteren Position des Embryoblasten liegen (Abb. 2c), oder aber in einer „Überwanderung“ des Embryoblasten durch den muralen Trophoblasten beim Übergang zum Blastozystenstadium (Denker 1972 und 1983; Gardner und Davies 2002).

Es gibt eine Reihe von Gründen, die viele Embryologen (besonders im angloamerikanischen Raum) dazu veranlasst haben, die Segregationshypothese für Säuger zu verwerfen. Einen zusammenfassenden Überblick hierzu gibt Denker (1976, 1983). Eine detaillierte Erörterung findet sich auch in den Diskussionskapiteln 4.9 und 4.11 dieser Arbeit. In jüngerer Vergangenheit haben dennoch einige experimentelle Befunde, die im folgenden Abschnitt besprochen werden, die Segregationshypothese wieder zum Gegenstand der Diskussion gemacht.

1.4 Vorbefunde zur Leptinverteilung im präimplantativen Säugerembryo

Die amerikanische Arbeitsgruppe um Antczak und Van Blerkom legte 1997 Befunde vor, die für das Hormon Leptin und den Transkriptionsfaktor Stat3 in Präimplantationsstadien von Mensch und Maus ganz im Sinne der Segregationshypothese eine polare Verteilung zeigen (Antczak und Van Blerkom 1997) (vgl. auch Diskussion und Abbildungen 29-32). Von der intraovariellen Oozyte an über alle präimplantativen Stadien hinweg bis zur Blastozyste wurden beide Proteine immunhistochemisch und per Western Blot nachgewiesen. Der immunhistochemische Nachweis wurde anhand von Whole-mount-Präparaten geführt, sodass nach konfokaler Laserscanning-Mikroskopie dreidimensionale Rekonstruktionen der Proteinverteilung errechnet werden konnten. Die höchste Konzentration von Leptin und Stat3 findet sich nach diesen Autoren im Bereich des animalen Pols der Zygote. Die Leptin-/Stat3-reichen Domänen werden im Rahmen der Furchungsteilungen auf die Blastomeren verteilt. Dabei weist nicht nur der Embryo im Ganzen einen Gradienten auf, sondern auch in jeder Blastomere zeigt sich ein solcher Gradient, d.h. eine halbmondförmige Konzentration der Fluoreszenz unter der äußeren Plasmamembran. In der Blastozyste enthält der Embryoblast fast kein Leptin mehr. Die leptinreichste Domäne ist dann der murale und abembryonale Trophoblast. Diese Befunde sind von Antczak und Van Blerkom als Nachweis einer Segregation von zygotischen Zytoplasmabestandteilen beim Säuger gewertet worden.

Zwei Jahre nach ihrer ersten Publikation legten Antczak und Van Blerkom (1999) eine weitere Arbeit vor, die die Ergebnisse der ersten stützte und erweiterte: Neben Leptin und Stat3 seien auch Bax, Bcl-x, TGF β 2, VEGF, c-kit und EGF-R in gleicher Weise polar

verteilt. Ein zusätzlicher Schwerpunkt der zweiten Arbeit liegt auf der Untersuchung von Fragmentationsprozessen, wie sie bei Störungen der Furchungsteilungen vorkommen, und dem damit einhergehenden Verlust von mehr oder weniger bedeutsamen Mengen der genannten Proteine. Aus diesen Befunden wird gefolgert, dass ein Verlust an den genannten Proteinen im Ein- oder Zweizellstadium das Entwicklungspotenzial der Embryonen eher beeinflusst als in späteren Stadien. Sind die an den genannten Proteinen ärmeren Zytoplasmaareale aber von Fragmentation betroffen, so wirkt sich dies deutlich weniger auf die Entwicklung des Embryos aus. Für die Befunde von Antczak und Van Blerkom steht allerdings eine Bestätigung von seiten anderer Arbeitsgruppen und unter Einschluss anderer Spezies oder anderer Techniken aus.

1.5 Ziele dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, mit der gleichen Methodik wie Antczak und Van Blerkom (1997, 1999) die Verteilung von Leptin in präimplantativen Kaninchenembryonen zu untersuchen. Zum einen sollen dabei diese Beobachtungen an einer anderen Spezies überprüft werden, zum anderen soll die Aussagekraft der von Antczak und Van Blerkom verwendeten Methodik (Ganzpräparate und CLSM) durch die Anwendung von histologischen Realschnitten kritisch hinterfragt werden. Dies erschien wichtig, da bei der Immunhistochemie an Ganzpräparaten wegen der Dicke der Objekte zumindest zwei Arten von Artefakten denkbar sind, die die Ergebnisse verfälschen könnten: zum einen Diffusions-/Penetrationsartefakte und zum zweiten Fluoreszenzlichtabsorptions- und Quenchingphänomene. Das Kaninchenmodell wurde gewählt, weil die frühe Morphogenese des Kaninchens der des Menschen recht nahe kommt. Darüber hinaus werden Hinweise auf eventuelle Asymmetrien zytoskelettaler Elemente im Hinblick auf die Frage, wie ein Gradient diffusibler Proteine aufrecht erhalten werden könnte, gesucht.

Die hier vorgelegte Dissertationsarbeit verfolgt daher folgende konkrete Ziele:

1. Lieferung neuer histochemischer Beiträge zur Überprüfung der bestehenden Auffassungen zu frühembryonalen Determinationsmechanismen beim Säuger.
2. Überprüfung der von Antczak und Van Blerkom 1997 für Maus- und menschliche Embryonen vorgelegten Befunde zur Verteilung von Leptin in Präimplantationsstadien mit demselben Verfahren (Totalpräparate, CLSM) am Kaninchenembryo.
3. Überprüfung dieser Verteilungsmuster mit einem alternativen methodischen Vorgehen, nämlich der Leptin-Immunhistochemie am histologischen Realschnitt.
4. Vergleich der Ergebnisse beider Methoden.

5. Überprüfung der Verteilung von Zytokeratinen als Marker der frühen Differenzierung des Trophoblasten.
6. Methodenkritische Diskussion der Möglichkeiten zur Artefaktentstehung bei Immunhistochemie an Totalpräparaten und CLSM-Auswertung im Vergleich zur Immunhistochemie an histologischen Realschnitten.
7. Diskussion der erzielten Ergebnisse im Kontext der existierenden Daten, insbesondere der aktuellen Literatur über Trophoblast- und Embryoblastdifferenzierung und der Achsenbildung in der frühen Säugetierentwicklung.

2. Material und Methoden

2.1 Embryonengewinnung

Geschlechtsreife weibliche Weiße Neuseeländer-Kaninchen werden von den Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Sie werden unter den üblichen Laborbedingungen gehalten und nach Bedarf belegt. Die Tötung erfolgt je nach dem zu untersuchenden Embryonalstadium, z.B. 80 Stunden nach der Verpaarung (=post coitum, =p.c.), mittels Injektion von 4ml Ketamin + 1 ml Xylazin in die Ohrvene. Uterus und Tube werden entnommen und mit Hilfe einer Knopfkanüle (für die Tube) oder der Spritzenspitze selbst (für den Uterus) ausgespült. Dies geschieht mit einer gepufferten Salzlösung (Hepes, Zusammensetzung siehe Anhang). Während zur Gewinnung von Morulae (54 bis 56 Stunden alt) nur die Tube ausgespült werden muss, sind die untersuchten frühen Blastozysten (69-80 Stunden) am Übergang der Tube in den Uterus oder im Uterus zu erwarten, so dass beide Organe durchspült werden müssen. Zur Gewinnung expandierender Blastozysten (96 Stunden) kann wiederum auf das Ausspülen der Tube verzichtet werden (Denker 1970 a/b). Die Embryonen wurden in Boveri-Schälchen hineingespült und unter einem Binokularmikroskop gezählt und kurz begutachtet.

30 für dieses Projekt eingesetzte Neuseeländer Kaninchen waren schwanger und lieferten insgesamt 204 Embryonen. 86 Embryonen aus 15 Kaninchen wurden in Epon, Araldit oder LR-White eingebettet. Für Whole-Mount-Immunhistochemien wurden 118 Embryonen eingesetzt. Aufgrund des Verlusts von Embryonen wegen der Schwierigkeiten bei der Entfernung der Keimhüllen (vgl. Kapitel 4.3) verbleiben am Ende des kompletten Protokolls nur 75 Embryonen, die gescannt werden konnten. 22 davon lieferten gut verwertbare Bilder. 20 Embryonen dienten als Negativkontrollen.

Verwendung der gewonnenen Embryonen			
Ganzpräparate		Realschnittpräparate	
Embryonen eingesetzt	118	Embryonen eingesetzt	86
Am Versuchsende erhalten	75	Am Versuchsende erhalten	83
Leptin-IHC	30	Einbettung in LR-White	11
Komarkierungen Leptin + X	6	Einbettung in Epon	72
Zytokeratin-IHC	12		
Aktin-Phalloidin-TRITC	7		
Negativkontrollen	20		
Embryonen gesamt 204			

2.2 Immunhistochemie am Ganzpräparat („Whole-Mount-IHC“)

2.2.1 Präparat-Vorbereitung

Die präimplantativen Embryonen sind beim Kaninchen nicht nur von einer Zona pellucida umgeben sondern werden von mehrschichtigen Hüllen, deren Zusammensetzung sich im Verlauf der Präimplantationsphase ändert, geschützt. Dies bringt besondere Probleme bei der Immunhistochemie mit sich, weswegen diese Hüllen hier kurz beschrieben werden sollen. Abbildung 4 zeigt schematisch eine Furchungsstadium mit den umgebenden Hüllen. Nachdem die Mukoproteidschicht bis etwa zum dritten Tag an Dicke zunimmt, dünnt sie im Zuge der Expansion der Blastozystenöhle aus und wird schließlich von der sog. Neozona abgelöst (vgl. Abb. 33) (Denker 2000). Ab dem fünften Entwicklungstag lagern sich von außen Uterussekretbestandteile an, die als Gloiolemma bezeichnet werden. Im Falle des normalen Fortgangs der Schwangerschaft werden die Hüllen im Uterus unmittelbar vor der Implantationseinleitung durch spezielle Proteinasesysteme, vor allem Blastolemmase, aufgelöst, so dass die Adhäsion an das Uterusepithel ungehindert stattfinden kann.

Bei der Immunhistochemie am Ganzpräparat würden die Hüllen die Penetration der Antikörper verhindern, sodass sie zunächst beseitigt werden müssen. Die Arbeitsgruppe Antczak und Van Blerkom (1997, 1999) hatte angesichts des einfacheren Aufbaus der Hüllen bei Mensch und Maus ein rein mechanisches Verfahren zur Entfernung der Hüllen anwenden können, das aber bei der dicken Mukoproteidschicht des Kaninchens nicht praktikabel ist. In unseren Versuchen werden die Embryonen (nach einem Vorschlag von A. Herrler, pers. Mitteilung) zunächst 2 Min. in einer PBS-Lösung pH=2,5 in ein saures

Milieu überführt. Anschließend folgt das eigentliche Abdauen durch Pronase E 0.05% in PBS (mit Calcium 0,1g/l pH 7,6) bei 37°C für 6 Min.. Die Embryonen werden mehrfach in eine fein ausgezogene Pasteurpipette hinein- und herauspipettiert, bis sie sich aus den aufgeweichten Blastozystenhüllen lösen. Der enzymatisch-mechanische Abдавorgang muss unter ständiger visueller Kontrolle unter der Binokularlupe erfolgen, da die Hüllen durch das Andauen eine extrem adhäsive Oberfläche entwickeln. In diesem Arbeitsschritt treten mit Regelmäßigkeit und trotz Übung Embryonenverluste auf. Die Embryonen werden anschließend 1 Stunde in (para)Formaldehyd (3% in PBS) fixiert. Durch die Fixierung gewinnen die Embryonen deutlich an Stabilität. Embryonenverluste durch Fragmentation, wie sie im vorgenannten Arbeitsschritt oftmals zu beklagen sind, finden nach der Fixierung kaum noch statt. Nach dem Auswaschen der Fixierlösung (10 Min. PBS) erfolgt eine Permeabilisierung der Zellmembran mit den Detergenzien Triton X-100 und Igepal jeweils 0,1% in PBS. Nach erneutem Waschen (2x10 Min. PBS-BSA 2%) erfolgt eine Proteolyse mit Proteinase K 10µg/ml für 20 Min bei Raumtemperatur zur Wiederherstellung bei der Fixierung verloren gegangener Antigenität („antigen-retrieval“). Nach jeder Proteolyse wird die Proteinase K zunächst ausgewaschen (10 Min. PBS-BSA 2%) und dann durch eine Postfixierung (3% (para)Formaldehyd für 30 Min.) inaktiviert. Anschließend erfolgt eine Blockierung möglicher unspezifischer Immunglobulinbindungsstellen mit PBS-BSA 2% für 1 Std. bei Raumtemperatur.

2.2.2 Immunhistochemie

Für die Inkubation der Embryonen mit Lösungen, die nur in geringem Volumen zur Verfügung stehen, hat es sich bewährt, jeweils 30µl Tropfen der Lösung in eine Multiwellvertiefung vorzulegen und den Embryo mit möglichst wenig Transferflüssigkeit hineinzupipettieren. Auf diese Weise erfolgt die Erstantikörperinkubation bei 4°C über Nacht mit Schaf-anti-Leptin 1:100 in PBS-BSA 1% (Acris # BP585) bzw. Maus-anti-Pan-Zytokeratin 1:60 in PBS-BSA 1%. Für einige (anfängliche) Versuche stand ein weiterer Leptinerstantikörper (Abcam # S270, ebenfalls aus dem Schaf) zur Verfügung. Leider war dieser später nicht mehr erhältlich. Nach Auswaschen (2x PBS-BSA 2% 10 Min.) folgt die Zweitantikörperinkubation 2 Std. bei Raumtemperatur mit Alexa 488 Esel-anti-Schaf 1:200 (~10ng/µl) in PBS-BSA 1% bzw. Alexa 488 Ziege-anti-Maus 1:200 (~9ng/µl) in PBS-BSA 1%. Ab dem Einsatz der lichtempfindlichen fluorochrommarkierten Zweitantikörper werden alle Arbeitsschritte unter Lichtausschluss durchgeführt. Für Negativkontrollen werden unter strenger Beibehaltung des sonstigen Procederes entweder die Erst- oder die Zweitantikörperlösungen durch PBS-BSA 1% ersetzt. Für die Immunhistochemie am Semidünnschnitt wird eine weitere Kontrolle, die Präabsorption des Antikörpers mit dem Antigen, durchgeführt (s. Abschnitt 2.6). Wiederum nach

Auswaschen der Lösungen (2x PBS-BSA 2% 10 Min.) werden die Embryonen in Hohlschliffobjektträger pipettiert, mit Mowiol bedeckt und mit einem Deckglas eingedeckt. Das Deckglas muss seitlich mit Nagellacktropfen am Objektträger fixiert werden, um Stabilität auch bei inverser Mikroskopie zu gewährleisten.

2.3 Protokoll für die Aktin-Phalloidin-TRITC-Färbungen am Ganzpräparat

Für Aktin-Phalloidin-TRITC-Färbungen werden die Embryonen 2 Std. bei Raumtemperatur mit der nach Herstellerangaben vorbereiteten Lösung (enthält 25µg/ml TRITC in PBS) inkubiert und anschließend mehrfach mit PBS-BSA gewaschen.

2.4 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Die Auswertung der Präparate erfolgt mittels Konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie an einem Zeiss Axiovert 100M Mikroskop mit angeschlossener CLSM-Einheit (Model LSM 510; Carl Zeiss, Jena). Als Lichtquellen dienen ein Argon-Laser mit einer Anregungswellenlänge von 488nm und zwei Helium-Neon-Laser mit 543 bzw. 633nm Wellenlänge. Zur Darstellung der Alexa Fluor 488 Fluoreszenz wird ein 505nm Longpass-Filter in den Strahlengang eingeschaltet, für Alexa Fluor 546 ein 560nm Longpass-Filter und für TRITC Fluoreszenz ein 560 bis 565nm Bandpass-Filter. Virtuelle Schnittebenen werden unter Verwendung eines 40-fach vergrößernden Ölimmersionsobjektivs je nach Objekt in 0,8-2,35µm Intervallen gelegt. Der Öffnungsdurchmesser der Lochblende ('pinhole size') wird mit Hilfe der LSM-Software gewählt, die zu jedem eingestellten Blendendurchmesser an Hand der Daten des optischen Strahlengangs die Größe des korrespondierenden Airy-Scheibchens errechnet. Um konfokal zu arbeiten, wird der Durchmesser des Pinholes so gewählt, dass er 1 Airy-Scheibchen entspricht. Zur Minimierung von Rauschen wird jeder optische Schnitt achtmal gescannt und rechnerisch gemittelt. Die dreidimensionale Rekonstruktion der Ganzpräparate wird mit 'Zeiss LSM 5', der Bildverarbeitungssoftware zum Mikroskop, durchgeführt. Die in dieser Arbeit gezeigten Abbildungen in Falschfarbendarstellung entsprechen den in der genannten Software voreingestellten Farbpaletten 'rainbow' bzw. 'rainbow II'.

Die Kernaussage der Publikationen von Antczak und Van Blerkom (1997, 1999) stützt sich auf CLSM-Untersuchungen an präimplantativen Embryonen. Nachdem bekannt ist, dass die Laserstrahlen eines CLSM nur bedingt weit in Gewebe eindringen können, ein Problem das im Ergebnis- und Diskussionsteil noch zu thematisieren ist, und die hier vorgelegten Ergebnisse ebenfalls einen artefaktische Beeinflussung von CLSM-Befunden nahelegen (s. Kapitel 4.2), bestand das Bestreben, einen direkten experimentellen Zugang zur möglichen Ursache der Artefakte zu finden: Versuche, das geschilderte

Problem experimentell anzugehen bestanden in der Konstruktion eines „Aquariums“ aus verklebten Deckgläsern, welches dann auf einem Objektträger gewendet werden kann. Leider konnte das CLSM so kaum verwertbare Bilder aufnehmen, weil der Embryo in dieser Kammer (mehr als auch im Hohlsliffobjektträger) so sehr schwamm, dass die automatische Fokussierung nur noch verwaschene Bilder lieferte. Eine positionsgenaue Fixierung des Objekts ist aber Voraussetzung, um den Embryo in Mikrometerschritten zu scannen. Völlig unmöglich wurde die Betrachtung des Embryos mit Ölimmersionsobjektiven, weil sich bei Fokussierung immer minimale Kräfte auf Deckglas und Aquarium übertragen. Daher blieb es in den genannten Fällen beim visuellen Eindruck am Okular. Danach scheint eine wie auch immer geartete systematische Ausrichtung des Embryos im Eindeckmedium nicht wahrscheinlich, d.h. dass zum Beispiel die Blastozystenöhle nicht immer okularnah oder –fern zu liegen kam.

2.5 Einbettung der Embryonen

Die Gewinnung von Embryonen des gewünschten Alters-/ Entwicklungsstadiums erfolgt wie oben beschrieben, allerdings entfällt in diesem Fall das Abdauen der Mukoproteidschicht. Anschließend Fixierung in 3% (para)Formaldehyd und 0.1% Glutaraldehyd in einem 0,1M Phosphatpuffer (pH 7,6), für Embryonen 60 Min. bei Raumtemperatur; Kontroll-Gewebe (Tube oder Uterus) werden auf eine Kantenlänge von circa 1mm zurecht geschnitten, 4 Std. auf dem Rüttler fixiert. Danach Auswaschen in Phosphatpuffer (3x 5 Min. für Embryonen, 3x 15 Min. für Gewebe); Verbleib in frischem Puffer über Nacht. Anschließend Entwässerung in der aufsteigenden Alkoholreihe (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96%, 3x100%): Embryonen jeweils 15 Min., Gewebestücke jeweils 45 Min.. Einbettung über das Intermedium Propylenoxid. Zunächst reines Propylenoxid (2x8 Min. für Embryonen, 2x15 Min. Gewebe), dann Epon:Propylenoxid 1:2, 1:1 und 2:1 jeweils 45 Min. für Embryonen bzw. 120 Min. für Gewebe gefolgt von reinem Epon über Nacht. Das Epongemisch setzt sich wie folgt zusammen:

- PolyBed 812 21ml
- Dodeceny succinylsäureanhydrid (DDSA) 13 ml
- Nadic Methylanhydrid 11 ml
- DMP-30 0.7-0.9 ml

Nach Epon-Polymerisierung für 3 Tage bei 60°C folgt das Semidünnschneiden (Schnittdicke ca. 0,75µm). Wichtig ist die schonende Antrocknung des Schnitts am Objektträger (ca. 1 Stunde auf einer 40°C Heizplatte) zur Erhaltung der Antigenität.

Verwendet werden silanisierte Objektträger, um dem Abschwimmen des Schnitts vorzubeugen. Die Silanisierung erfolgt nach den Angaben des Herstellers mit 2% Silane in Aceton.

2.6 Immunhistochemie am Semidünnschnitt

2.6.1 Fluoreszenzmikroskopische Nachweise

Um Lösungen, die nur in geringen Volumina zur Verfügung stehen (Antikörperlösungen), auftropfen zu können, werden die Schnitte mit einem PAP-Pen umrandet. Alle übrigen Arbeitsschritte werden in Färbeküvetten durchgeführt. Da wässrige Lösungen die Eponschnitte nicht durchdringen können, ist es notwendig, das Harz mit einer Natriummethoxid-Lösung (wasserfrei, unverdünnt, 1 Std. bei Raumtemperatur) herauszuätzen. Das Ansetzen des Natriummethoxids erfolgt mindestens zehn Tage vor Gebrauch der Lösung durch Gabe von 15g Natriumhydroxid-Plätzchen in 100ml reinen unvergällten Ethanol. Es dürfen weder Wasser noch Luftfeuchtigkeit eindringen. An den Ätzvorgang schließt sich eine absteigende Alkoholreihe (100%, 96%, 90%, 75%, 50%, 25%, a.d., a.d.) jeweils 2 Min. an. Auch hier erfolgt wie bei den Ganzpräparaten zur Wiederherstellung der Antigenität eine Proteolyse mit Proteinase K (8 µg/ml 12 Min. bei Raumtemperatur) gefolgt von kurzem Abspülen und einer Nachfixierung (3,7% (para)Formaldehyd in H₂O 20 Min.). Es folgt die Blockierung unspezifischen Bindungsverhaltens der Antikörper durch Inkubation des Schnittes mit 1% Rinderserumalbumin (BSA) in PBS oder 5% Serum der Spezies, in der der Zweitantikörper erzeugt wurde, beides 90 Min. bei RT. Der Anti-Leptin-Antikörper (vgl. Ganzpräparate, Kapitel 2.2.2) wird in einer Verdünnung von 1:150, der Zytokeratin-Antikörper (vgl. Ganzpräparate, Kapitel 2.2.2) in einer Verdünnung von 1:100 jeweils in PBS-BSA 1% gebraucht. Die Applikation erfolgt in Tropfen à 30µl im PAP-Pen-Ring über Nacht bei 4°C in der feuchten Kammer. Mit dem PAP-Pen können Ringe auf Objektträgern aufgetragen werden, innerhalb derer Lösungen als Tropfen appliziert werden können ohne zu verlaufen. Nach Waschen mittels PBS-BSA 1% (zunächst überrinnend, anschließend 3x10 Min.) folgt die Inkubation mit den oben genannten Zweitantikörpern in gleicher Weise. Verwendet werden wie für die Ganzpräparate Alexa Fluor 546 Esel-anti-Schaf 1:250 (~8ng/µl) und Alexa Fluor 488 Ziege-anti-Maus 1:150 (~13ng/µl) in PBS-BSA 1%, jedoch erfolgt die Inkubation für 2 Std. bei Raumtemperatur und, wie auch alle folgenden Arbeitsschritte, unter maximalem Lichtausschluss. Nach Auswaschen der Zweitantikörperlösung mit PBS-BSA 1% (zunächst überrinnend, anschließend 3x10 Min.) folgt die Montage des Deckglases mit Mowiol.

Für Negativkontrollen werden unter strenger Beibehaltung des sonstigen Procederes entweder die Erst- oder die Zweitantikörperlösungen durch PBS-BSA 1% ersetzt. Für einige Negativkontrollen wird zudem der Leptin-Erstantikörper mit rekombinantem

humanem Leptin präabsorbiert: Dazu werden 0,5µl Antikörper (BP585) [44µg/µl] mit 4,5µl Leptin [5µg/µl] in 70µl PBS versetzt. Das entspricht etwa der gleichen Masse an Leptin und BP 585 im Ansatz. Da Leptin (18kD) nur etwa ein Zehntel des Molekulargewichts des IgG-Molekül (150kD) hat, setzt man mit der gleichen Masse aber die zehnfache Konzentration an Leptinmolekülen (also im deutlichen Überschuss) ein. Der Ansatz wird 2 Std. bei 37°C inkubiert und anschließend 15 Min. bei 25500g zentrifugiert. Eingesetzt wird statt des Erstantikörpers nun der Zentrifugationsüberstand.

2.6.2 Alternativverfahren

Silberverstärkte Immunogoldreaktion und Meerrettichperoxidase-Markierung

Diese methodischen Varianten wurden in begrenzten Vorversuchsreihen zum Vergleich eingesetzt, wobei sie die fluoreszenzmikroskopisch erhobenen Befunde stets bestätigten. Wegen der besseren Vergleichbarkeit der Daten mit den CLSM-Befunden entschieden wir uns, die datenerhebenden Versuche dann mit Fluorochromen durchzuführen.

Silberverstärkte Immunogoldreaktion:

Das Procedere entspricht bis zur Inkubation mit dem Zweitantikörper dem oben beschriebenen. Statt eines fluorochrommarkierten Zweitantikörpers kommt aber ein goldpartikelkonjugierter Antikörper zum Einsatz, wie er auch in der Transmissionselektronenmikroskopie Verwendung findet. Für den Sigma Pan-Zytokeratin-Erstantikörper wird ein 6nm-Gold-Ziege-anti-Maus-Zweitantikörper 1:20 verdünnt benutzt. Nach Auswaschen der Lösungen mit Tris-Puffer (0,05 M, pH 8,2, je 5 Min.) erfolgt eine Postfixierung in 2% Glutaraldehyd (in PBS pH 7,2; 2 Min.), die Inkubation mit kommerziell erhältlicher Entwicklerlösung (Silbernitratlösung in Zitronensäurepuffer) und abschließend die Fixierung in fotografischem Fixierer und der Einschluss. Das Protokoll lehnt sich an an Hacker (1992).

Meerrettichperoxidasemarkierung und Antigen-Retrieval durch Hitzebehandlung:

Ebenfalls alternativ zur Fluoreszenz testeten wir eine Reaktion mit meerrettichperoxidasemarkierten Zweitantikörpern, die nach Inkubation mit 3',3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) einen Farbumschlag nach braun hervorrufen. Im Rahmen des Antigen-Retrievals habe ich anstelle von Proteinase K auch Hitze-/Mikrowellenbehandlung der Semidünnschnitte erprobt, wie sie z.B. von Saito (Saito et al. 2003) beschrieben wurde. Allerdings führte weder eine Hitze- noch eine Mikrowellenbehandlung zu einer Verbesserung des Ergebnisses (sei es die Intensität der

Reaktion oder die Morphologie). Die Ergebnisse werden daher im Folgenden nicht im Detail beschrieben und ausgewertet.

2.7 Protokoll für die Aktin-Phalloidin-TRITC-Färbungen am Semidünnschnitt

Für Aktin-Phalloidin-TRITC-Färbungen werden die Schnitte 2 Std. bei Raumtemperatur mit der nach Herstellerangaben (Sigma) vorbereiteten Färbelösung inkubiert und anschließend mehrfach mit PBS-BSA gewaschen.

2.8 Auswertung der Semidünnschnitte am CLSM und 3D-Rekonstruktion

Die Semidünnschnitte werden am gleichen Mikroskop (Model LSM 510; Carl Zeiss, Jena) wie die Ganzpräparate gescannt. Die Strahlengangseinstellungen bezüglich Laser und Filtern entsprechen den für die Ganzpräparatauswertung beschriebenen (s. Kapitel 2.4).

3D-Rekonstruktion aus Realschnitten:

Einer der Vorzüge der CLSM ist die Möglichkeit der dreidimensionalen Rekonstruktion von Folgen zweidimensionaler Bilder. Bei unmittelbar im CLSM generierten Schnittserien („Z-Stapel“) liegen dafür notwendige Zusatzinformationen (Größe, Mittelpunkt, Rotation und Abstand der Schnitte untereinander) intrinsisch vor. Die „fehlenden“ Bildpunkte der Z-Ebene werden zwischen den gegebenen Punkten zweier Schichten interpoliert. Im Fall der Semidünnschnitte handelt es sich aber aus der Sicht der Software lediglich um eine nicht zusammenhängende Folge von Bilddateien. Auf das Importieren und die Eingabe der fehlenden Zusatzinformationen ist die LSM 5 Software von Zeiss nicht eingerichtet. Während sich die Größe (Pixel*Pixel) der Dateien einfach festlegen lässt, müssen die Rotation und mittige Orientierung des Embryos im Bild bei jedem Schnitt individuell eingestellt werden. Geringe Abweichungen von Schnitt zu Schnitt sind dabei nicht auszuschließen und führen zu einer Unschärfe des rekonstruierten Bildes. Für die 3D-Rekonstruktion der Semidünnschnitte wurde daher das Softwareprogramm „amira“ (Mercury Computer Systems, Berlin) verwendet. Der Abstand zweier Ebenen kann vorgegeben werden. Im vorliegenden Fall ist in der Regel jeder vierte Schnitt in eine Rekonstruktion eingegangen, so dass sich bei einer Schnittdicke von 0,75 µm ein Abstand von 3 µm ergibt. Die Nutzung der amira Software wurde uns freundlicher Weise von Dr. A. Schleicher (Forschungszentrum Jülich) ermöglicht.

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Vorversuche zur immunhistochemischen Methodik

Die Reaktivität der verwendeten Antikörper mit Kaninchenantigenen war vor Versuchsbeginn nicht bekannt. Daher wurde ihre Tauglichkeit in Vorversuchen an unfixierten und/oder (para)formaldehydfixierten Kryostatschnitten, Paraffinschnitten sowie an eponieingebettetem und geätztem Gewebe überprüft. Die Antikörper, die sich in diesen Vorversuchen als für die Untersuchung von Kaninchengewebe geeigneten erwiesen haben und Verwendung für Untersuchungen an Embryonen fanden, sind der Chemikaliensammlung im Anhang zu entnehmen. Anschließend wurden die einzusetzenden Verdünnungen und Inkubationszeiten optimiert. Als Kontrollorgane fanden Kaninchenuterus, -darm und -fettgewebe Verwendung. Für den Sigma Pan-Zytokeratin-Antikörper konnte am Uterusepithel, für die verwendeten Leptinantikörper an Fettgewebe eine deutliche und spezifische Reaktion nachgewiesen werden. Die detaillierte Beschreibung der Positivkontrollen findet sich jeweils im Zusammenhang mit dem zugehörigen Hauptversuch an entsprechender Stelle dieser Arbeit. Charakteristisch ist die Lokalisation des Leptins im schmalen perinukleären Zytoplasma. Als Vergleich aus der Literatur diente der Nachweis von Leptin in Fettgewebe durch Bornstein et al. (2000), die eine gleichartige Leptinverteilung im Fettgewebe beschrieben hatten wie wir sie hier zeigen konnten. Die zugehörigen Negativkontrollen waren wie bei Bornstein et al. eindeutig schwächer gefärbt. Einzelne Arbeitsschritte wie z. B. das Ätzen der Semidünnschnitte oder die Antigen-Retrieval-Proteolyse wurden ebenfalls in Vorversuchen an Gewebeschnitten getestet und bezüglich der Wirkkonzentration und Einwirkzeit optimiert. Andere Antigen-Retrieval-Strategien wie etwa das Erhitzen der Semidünnschnitte in Zitratpuffer in der Mikrowelle hatten keine weitere Verbesserung des Resultats gezeigt.

3.2 Auswertung der Ganzpräparate mittels CLSM

3.2.1 Leptindarstellung an frühen Morulae (56 Stunden p.c.)

Die von Antczak und Van Blerkom (1997, 1999) publizierten Befunde über eine polare Verteilung von Leptin im präimplantativen Säugerembryo konnten im Rahmen der hier vorgelegten Ergebnisse am Kaninchenembryo im Prinzip reproduziert werden, sofern die Embryonen wie bei den genannten Autoren als Ganzpräparat verarbeitet und untersucht wurden.

Abb. 5 zeigt einen repräsentativen virtuellen Schnitt etwa aus der Mitte eines 56 Stunden alten Embryos. Diese Morula hat ihre ursprünglich runde Form verloren und ist leicht eiförmig deformiert. Durch das vollständige Abdauen der Hüllen wird die namensgebende him- oder maulbeerartige Oberfläche des Embryos sichtbar. Die äußeren Zellen der Morula zeigen mit dem Leptinantikörper eine deutliche Fluoreszenz, während die inneren Zellen kein Signal emittieren. Auch bei Antczak und Van Blerkom (1997) stellt die Betonung der äußeren gegenüber den inneren Zellen eine der Kernaussagen dar. Innerhalb der äußeren Blastomeren ist das Signal nicht etwa homogen verteilt, sondern subapikal halbmondartig maximal ausgebreitet. Auf etwas unterschiedlichem Helligkeitsniveau trifft dies für alle abgebildeten Zellen zu. Abb. 6 zeigt die dreidimensionale Rekonstruktion desselben Embryos. Sie ist aus 52 einzelnen Scans im Abstand von jeweils 1,5 μm berechnet. Die Projektion erfolgt entlang der X-Achse (gilt ebenso für die folgenden Rekonstruktionen), so dass das Auge des Betrachters (wie der Laserstrahl) den Embryo vom Deckglas her antrifft. Deutlicher als im einzelnen Schnitt erkennt man in dieser 3D-Rekonstruktion, dass die Verteilung des Signals über die Zirkumferenz der Morula nicht gleichmäßig ist, sondern dass ein leptinreicher (gelber Stern) von einem leptinarmen (blaue Sterne) Pol zu unterscheiden ist. Ein weiteres Beispiel einer 54 Stunden alten Kaninchenmorula, bei der ein anderer Leptin-Erstantikörper (Anti-Leptin S270) zum Einsatz kam, zeigt Abb. 7. Der Eindruck einer ausgefransten Oberfläche, den dieser Embryo im Gegensatz zum vorigen bietet, ist vermutlich auf verbliebene Hüllenreste, teilweise aber auch auf den größer gewählten Abstand der virtuellen Schnittebenen (2,35 μm) zurückzuführen. Trotz einer gewissen Unschärfe sind auch hier die beschriebenen Charakteristika der Leptinverteilung zu beobachten, d.h. das Signal in den äußeren Zellen überwiegt bei subapikaler Betonung.

Abb. 8 zeigt eine CLSM-Schnittserie von einer weiteren 56 Stunden alten Morula. Abgebildet sind die alle Schnittebenen, die Fluoreszenz zeigen. Die Serie zeigt ein Phänomen, welches unter methoden-kritischem Aspekt ausführlich zu diskutieren sein wird: Vergleicht man den Beginn mit dem Ende der Serie, so zeigen sich bemerkenswerte Unterschiede. Ab 4 μm erscheinen einige gut markierte Blastomeren, die sich recht klar voneinander abgrenzen lassen. Es werden von Ebene zu Ebene deutlich größer werdende Zytoplasmateilchen angeschnitten. Im Zentrum der Morula weicht die Fluoreszenz einem verwaschenen Dunkel, während in den äußeren Blastomeren auch bis an die 35 μm -Marke starke Fluoreszenz zur Darstellung kommt, mit einem Maximum in den oberflächlichen, dem ehemaligen Perivitellinspalt zugewandten Zytoplasmateilchen. Bemerkenswerter Weise ist diese auf vielen Schnittebenen relativ gleichmäßig über die gesamte Zirkumferenz des Embryos verteilt. Jenseits einer Tiefe von 30 bis 35 μm

verblasst die Fluoreszenz rasch, dennoch bleibt erkennbar, dass noch Blastomeren angeschnitten werden. Wegen der Korrelation dieses Ablassens mit der zunehmenden Distanz zum Deckglas, liegt ein artefaktischer Ursprung der Signalabschwächung nahe. Auch auf den Schnittebenen zwischen $\sim 38\mu\text{m}$ und $\sim 44\mu\text{m}$ zeigt sich das oben beschriebene Färbemuster (Betonung außen gegenüber innen) in zunehmender Abschwächung. Ab der Ebene $10\mu\text{m}$ zeigt sich auf allen dargestellten Schnitten die größte Signalstärke im subapikalen Bereich der äußeren Blastomeren.

Abb. 9 zeigt die dreidimensionale Rekonstruktion desselben Embryos in Echt- (a) und in Falschfarben (b). Im Falschfarbenbild steht rot für hohe, gelb für mittlere und blau-grün für geringe Signalintensität. Deutlicher als die Schnittserie zeigt die Rekonstruktion des Präparats, dass die leptinreiche Domäne große Teile der Zirkumferenz der Morula einnehmen kann. Auffällig ist bei diesem Embryo eine relativ homogene Leptinverteilung im gut markierten Bereich (s. Diskussion). Eine kleine leptinarme Domäne ist in Abb. 9b durch ein blaues Sternchen gekennzeichnet. Sie kommt allerdings in einer seitlichen Projektion des Embryos (Abb. 9c) nicht eindeutig zur Darstellung. Die in den Abbildungen 9a und b zum Betrachter hin zeigende Fläche der Morula ist in Abbildung 9c die rechte Seite. Der besonders verschwommene Eindruck des Embryos im seitlichen Bild geht auf die Interpolation der zwischen zwei Messwerten (Abstand $1\mu\text{m}$) liegenden Pixel zurück. Alle Rekonstruktionen sind deshalb in seitlichen Ansichten weniger attraktiv als in Ansichten, die in ihrer Orientierung den ursprünglichen Schnittebenen entsprechen, da hierbei natürlich der Anteil an interpolierten Bildpunkten geringer ist.

Abbildung 10 zeigt eine Morula aus derselben Versuchsreihe wie die zuvor gezeigten. Das Präparat soll exemplarisch zeigen, wie sich sehr unvollständig abgedaute Blastozystenwänden auf die Verwertbarkeit des Objekts auswirken. Die angedauten Blastozystenwänden umgeben hier den Embryo, wenn auch exzentrisch, noch vollständig. Es fällt auf, dass die Wänden ein hohes Leptinsignal (mit Betonung der äußeren Randzone) ergeben. Da derartige Färbemuster prinzipiell auch auf Diffusionsartefakten beruhen können, ist die Überprüfung durch Immunhistochemie an Realschnitten (s. Kapitel 3.3) besonders wichtig (vgl. Diskussion). Das bei den oben beschriebenen Embryonen geschilderte Signalmuster der Blastomeren ist aber trotz der Wändenreste auch hier wieder zu beobachten.

3.2.2 Leptindarstellung an späten Morulae (69 Stunden p.c.)

Die Abbildungen 11 und 12 zeigen eine 69h Morula mit Leptin-Immunhistochemie, zum einen als Schnittserie (Abb. 11) und als dreidimensionale Rekonstruktion (Abb. 12) jeweils in Falschfarbendarstellung. Deutlich wird die polare Verteilung des Signals mit maximaler Intensität in rotem Farbcode. Die Leptinverteilung ähnelt der von Antczak und Van Blerkom (1997) (Abb. 29-32) beschriebenen (detaillierte Beschreibung in der Diskussion Kap. 4.5). Auf die suggestive Falschfarbendarstellung wird bei der Präsentation der Ergebnisse dieser Arbeit jedoch im Folgenden so weit als möglich verzichtet.

Die Grundzüge der Leptinverteilung bei der späten Morula (69 Stunden p.c.) unterscheiden sich nicht von den für die frühe Morula beschriebenen. Auch hier gibt es einen klaren Unterschied zwischen leptinarmen inneren und leptinreichen äußeren Blastomeren. Der in Abbildung 12 gezeigte morphologisch sehr schön erhaltene Embryo lässt die einzelnen Blastomeren gut erkennen. Die Abbildung zeigt die im Abstand von 1.0µm aufgenommenen virtuellen Schnitte der Morula in Falschfarben (Intensitätslegende im Bild). Durch die Falschfarbendarstellung kommen auch extrem geringe Singalintensitäten zur Darstellung. Ähnlich wie bei der in Abbildung 8 gezeigten Morula entsteht der Eindruck, das detektierte Signal würde bereits ab dem Schnitt 35µm deutlich ablassen. Zumindest auf den folgenden zehn Schnitten (d.h. 10µm) sind die Blastomeren aber offensichtlich noch gut, d.h. nicht nur peripher, angeschnitten. Ob es sich bei diesem Phänomen des Ablassens um eine reale Ungleichverteilung, oder ein Artefakt handelt, kann aber allein anhand dieser Serie nicht zweifelsohne beantwortet werden. (Hierzu vgl. auch den folgenden Abschnitt (3.2.3) zur Aktindarstellung). Eine offenbar zusammenhängende leptinreiche Domäne ist aber im Bereich bis 30 µm zu erahnen: Vor allem auf den Schnitten zwischen 23 und 27µm ist das Signal entlang der Zirkumferenz ungleich verteilt. Hier entsteht schon auf den virtuellen Schnitten der Eindruck einer leptinreichen und –armen Domäne. Diese ist aber auf der dreidimensionalen Rekonstruktion (Abbildung 12) deutlicher zu erkennen. Andererseits ist natürlich in dieser „Aufsicht“ das Phänomen der Abschwächung des Signals in Zentrum der Morula nicht beurteilbar.

3.2.3 Aktin-Phalloidin-TRITC-Markierungen

Die beschriebenen Leptinverteilungsmuster, die die Whole-Mount-IHC bei Darstellung im CLSM ergibt, werfen die Frage auf, ob sie durch Spezifika der CLSM-Technologie verfälscht worden sein können, insbesondere ob das Problem der Eindringtiefe des Laserstrahls oder des Fluoreszenz-Quenchings die Muster beeinflusst haben könnten.

Auch unzureichende Penetration der Inkubationslösungen, Autofluoreszenz oder andere Störfaktoren könnten Asymmetrien vortäuschen (ausführlicher diskutiert in Kapitel 4.2). Als Kontrolle für evtl. CLSM-Artefakte wurde daher eine Darstellung des filamentären Aktins mit der Phalloidin-TRITC-Färbung gewählt. Dies scheint aus zweierlei Gründen sinnvoll: zum einen, weil durch die Wahl eines niedermolekularen Reagenz statt der hochmolekularen Antikörper Penetrationsartefakte minimiert werden, zum anderen aber auch weil mit dem Aktin ein ubiquitär vorkommender und in allen Blastomeren zu erwartender Zytoplasmabestandteil gefärbt wird, der außerdem vor allem in seiner filamentären (polymerisierten) Form nicht frei diffusibel ist.

Die folgenden Abb. 13-15 zeigen einen virtuellen Einzelschnitt (Abb. 13), die ganze Schnittserie (Abb. 14) und die Rekonstruktion (Abb. 15) desselben Embryos. Der virtuelle Schnitt macht bereits deutlich, dass bei der Phalloidin-TRITC Färbung ein völlig anderes Muster als im Fall der Leptin-IHC zur Darstellung kommt. Bis ins Zentrum des Embryos nimmt das Fluoreszenz-Signal nicht ab. Alle angeschnittenen Blastomeren sind unabhängig von ihrer Position im Embryo angefärbt. Die nicht markierten Areale im Inneren der Zelle entsprechen den nicht gefärbten Zellkernen, die kein Aktin enthalten. Grundsätzlich ähnelt diese Verteilung Vorbefunden zur Aktinverteilung in präimplantativen Embryonen des Schweins (Albertini et al. 1987). Beim Schweineembryo war eine in den frühesten Furchungsstadien beginnende Konzentration des Aktins im Blastomerenrandbereich, also dem Ort der zunehmenden Expression von Interzellularkontakten, gezeigt worden. Im Morulastadium zeigte sich dann eine homogene Färbung aller Blastomeren unter Aussparung der Kerne (s. diesbzgl. auch Diskussion 4.1.1).

In unseren Versuchsserien zeigt sich, dass die Signalintensität bei gleichbleibendem Verteilungsmuster in den dem Laserstrahl abgewandten Schnitten abnimmt (Abb.14). Jenseits etwa 55µm Eindringtiefe wird dieser Effekt besonders deutlich. Während in der X- und Y-Dimension also ein verlässliches Signal vorliegt, kann in der Übereinanderfolge der Schnitte (Z-Stapel) nur bis zu dieser Grenze von einem verlässlichen Signal ausgegangen werden. Damit kann die Phalloidin-TRITC-Markierung in diesem ersten Bereich als Positivkontrolle für emittiertes Signal dienen. Jenseits etwa 55µm Eindringtiefe hingegen muss eine artefaktische Signalabschwächung angenommen werden. Bemerkenswert ist auch die Tatsache, dass sich die Signalverteilung im einzelnen Schnitt dabei nicht nennenswert ändert, das Abblenden also äußere wie innere Blastomeren gleichermaßen betrifft.

3.2.4 Zytokeratindarstellungen

Die Expression von Zytokeratinen beginnt bei verschiedenen Säugetierspezies, die bisher untersucht wurden, erst während der ersten Tage nach der Befruchtung (s. Diskussion 4.1.2). Dem entspricht unser Befund, dass beim Kaninchenembryo erst in späteren Stadien an Morulae mit Spalt und frühen Blastozysten (80 Stunden p.c.) ein Zytokeratinnachweis gelingt (Abb. 16-18). Der noch junge Trophoblast (Abb.16) ist stärker markiert als der Embryoblast. Der durch Fixierung und Einschluss in Mowiol bedingte Kollaps der Blastozystenhöhle hat dazu geführt, dass der hell markierte murale/abembryonale Trophoblast (gelbes Sternchen) nunmehr dem dunkleren Embryoblasten (blaues Sternchen) anliegt. Zwischen Embryoblast und embryonalem Trophoblasten blickt man noch in ein erhaltenes Restlumen der Blastozystenhöhle (rotes Sternchen). Die seitliche Ansicht (Abbildung 17) zeigt die räumlichen Verhältnisse deutlicher: Unten der kollabierte murale Trophoblast, der der oben liegenden inneren Zellmasse anliegt. Der Embryonalpol der Blastozyste geht ins Dunkel über, wobei Zellgrenzen nicht mehr erkennbar sind. Insgesamt waren die Zytokeratinsignale in der jungen Blastozyste noch sehr schwach. In noch früheren Stadien (Morulae 54 Stunden p.c.) waren mit der verwendeten Methodik (Immunhistochemie und CLSM) keine ausreichenden Signale zu erreichen, die einen Vergleich zwischen einzelnen Blastomerengruppen (präsumptiver Embryoblast versus Trophoblast) ermöglicht hätten.

Abbildung 19 zeigt eine Positivkontrolle zu diesen Untersuchungen: zwei (para)formaldehydfixierte Kryostatschnitte aus dem Kaninchenuterus, die mit Sigma Pan-Zytokeratin-Erstantikörper und mit Alexa 488 Zweitantikörper (a), bzw. als Negativkontrolle (b) nur mit Zweitantikörper behandelt wurden. Das Reaktionsmuster ist typisch für die Verteilung von Zytokeratinen in Epithelien: Die subapikalen Zytoplasmaareale sind betont, auch entlang der lateralen Zellmembran zeigt sich ein deutliches Signal. Die Negativkontrolle zeigt keine nennenswerte Reaktion.

3.3 Auswertung der Semidünnschnitte/Realschnitte

Ausgangspunkt bei der Wahl dieses Vorgehens war zum einen das Bestreben, Diffusionsartefakte dadurch ausschließen zu können, dass die immunhistochemische Nachweisreaktion statt am Ganzpräparat am histologischen Schnitt durchgeführt wurde. Zum zweiten konnten dadurch bei der CLSM mögliche Artefakte durch die Dicke des virtuellen Schnitts vermieden werden. Der hohe Wassergehalt der Blastomeren warf allerdings besondere Probleme bei der histologischen Bearbeitung zur Herstellung von Realschnitten von frühen Säugetierembryonen auf, insbesondere bei Kryostatschnitten

und bei Paraffineinbettung. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurden Einbettungen in die Kunstharze LR-White und Epon erprobt. LR-White bewährte sich für die immunhistochemische Darstellung der hier interessierenden Antigene nicht, da keine ausreichend starke Markierung zu erzielen war. Erfolgreich war dagegen die Einbettung in Epon mit anschließender Ätzung des Harzes mit Natriumethoxid.

Ein gewisses methodisches Problem lag in der Ungleichmäßigkeit des Ätzvorgangs. Auch regelmäßiges Bewegen der Ätzküvette oder dauerhaftes Rühren während des Ätzens auf einem Magnetrührer haben hier keinerlei Veränderung erbracht. Bei Vorversuchen mit großflächigen Uterusschnitten war der Effekt besonders deutlich, bei Embryonen variierte innerhalb ein und desselben Schnittes die Signalintensität nur leicht. Dennoch bleibt auch innerhalb des nur etwa 150 µm großen Embryoschnitts, insbesondere beim Vergleich mehrerer Schnitte miteinander, dieser Effekt zu berücksichtigen.

3.3.1 Leptindarstellung an frühen Morulae (54 Stunden p.c.)

Jeder Embryo liefert zwischen 70 und 90 Epon-Semidünnschnitte à 0,75 µm mit auswertbaren Anschnitten von Zellen. Abbildung 20 zeigt eine Leptindarstellung an einem repräsentativen Schnitt etwa durch die Mitte einer 54 Stunden alten Morula. Abbildung 21 zeigt einen benachbarten Schnitt in Falschfarbendarstellung. Die Morphologie des Präparats ist sehr gut (und bedeutend besser als die der Ganzpräparate nach Hüllenabdauung). Man findet je nach Ebene des Schnittes verschieden viele Blastomeren innerhalb der Hüllen der Morula, die in diesen Stadien schon recht dick sind. Die Oberfläche der Blastomeren ist scharf begrenzt und lässt die typische Morulaform („maulbeerartig“) erkennen. Innerhalb des Zytoplasmas fallen kleinere, wie ausgestanzt wirkende, Strukturen auf. Es könnte sich unter Berücksichtigung von deren Größe, Zahl und Form um Mitochondrien handeln. Zellgrenzen lassen sich in der Leptin-IHC nur erahnen. Das Leptinsignal findet sich vor allem entlang der äußeren Zellmembran der Blastomeren, die dem perivitellinen Raum bzw. der Zona pellucida zugewandt ist, es folgt aber nicht oder allenfalls stellenweise den interzellulären Membranabschnitten. Bei höherer Auflösung erkennt man zwei Komponenten innerhalb dieser apikalen Signaldichte: ein die Membran exakt nachzeichnendes sehr helles Signal einerseits und einen nicht ganz so hellen halbmondförmigen Gradienten, der sich der apikalen Zytoplasmamembran anschmiegt. Für beide Komponenten des Signals gilt, dass eine Asymmetrie entlang der äußeren Zirkumferenz des Embryos im Sinne einer Polarität nicht zu beobachten ist. Während der perivitelline Raum sich als schwarzer Saum ohne Signal um die Blastomeren herum abzeichnet, lässt sich im Bereich der Zona pellucida

schemenhaft ein schwaches Signal erkennen. Die Mukoproteidschicht wird inhomogen angefärbt: Ganz innen liegt ein starkes ringförmiges Signal. Jenseits dieses Ringes nach außen hin fällt das Signal zunächst bis auf das schwarze Hintergrundniveau ab um dann im äußeren Teil der Mukoproteidschicht kontinuierlich bis zum Rand der Hüllen hin wieder anzusteigen. Auf einigen Schnitten entstehen durch Auffaltungen oder Überlagerungen signaldichtere Artefakte.

Bei manchen Schnitten sind heller-dunkler-Gradienten in (innerhalb der Serie von Schnitt zu Schnitt wechselnder) Ausrichtung zu beobachten, die den Embryo und die Hüllen umfassen, und vermutlich auf unterschiedlich starkes Ätzen (s.o.) zurückzuführen sind. Für eine artefaktische Genese spricht, dass solche Gradienten sich bei der Aneinanderreihung der Schnitte im Sinn einer Rekonstruktion der Serie als unsystematisch entpuppten, indem sie entweder von einem Schnitt zum nächsten verschwanden oder die Orientierung wechselten.

Zwei Arten von Negativkontrollen werden durchgeführt:

- a) Verwendung von Schafserum oder PBS statt Erstantikörper: Bei Verwenden identischer Scanparameter ist keinerlei Signal detektierbar (Abb.22). Nur nach Erhöhung der Empfindlichkeit (Detector Gain) erkennt man den undifferenziert gefärbten Embryo mit gleichermaßen flau angefärbten Hüllen. Dies gilt analog für alle Schnitte, sei es Embryo oder Fettgewebe, die mit Schafserum oder auch PBS statt des Erstantikörpers und mit dem zugehörigen Zweitantikörper behandelt werden.
- b) Verwendung von Leptin-präabsorbiertem Erstantikörper: Das Signal entlang der Blastomerenoberfläche (sowohl die linienartige Darstellung der dem perivitellinen Spalt zugewandten Membran wie auch der intrazytoplasmatische Halbmond) tritt in den präabsorbierten Kontrollen nicht auf und muss daher als leptinspezifisch angesehen werden (Abb.23). Gegenüber dem Hauptversuch ist außerdem der markierte Ring in der innersten Schicht der Mukoproteidschicht deutlich schwächer ausgeprägt. Im Hauptversuch ist die Signalstärke dieses Rings meist vergleichbar der der Blastomerenoberfläche. In der vorliegenden Negativkontrolle dagegen ist er stets stärker gefärbt als die (hier negative) Blastomerenoberfläche.

Die vorgenommenen Untersuchungen sind nicht geeignet, quantitative Aussagen zu treffen. Außerdem muss festgehalten werden, dass das Signal nicht überall vollständig verschwindet; ein Signal verbleibt inhomogen schollig im Zytoplasma und in den äußeren Lagen der Mukoproteidschicht, hier in identischer Erscheinung wie im Hauptversuch. Daraus muss geschlossen werden, dass der Antikörper nicht nur leptinspezifisch, sondern zusätzlich auch an einige Strukturen unspezifisch gebunden

wird. Da die Abschwächung bis Unterdrückung der Reaktion in den genannten Strukturen (peripheres Zytoplasma, Blastomerenoberfläche zum perivitellinen Spalt hin, innerste Lage der Mukoproteidschicht) aber deutlich und reproduzierbar ist, zeigt der Präabsorbtionsversuch als sehr stringente Kontrolle, dass es sich hierbei um echte Leptin-Lokalisationen handelt.

3.3.2 Leptindarstellung an späten Morulae und Blastozysten (69 bis 80 Stunden p.c.)

Trotz gleichen Alters der Embryonen zeigen sich in diesen Stadien bezüglich der Ausdehnung der sich bildenden Blastozystenhöhle beachtliche Unterschiede zwischen den Embryonen jedes Tieres (was aus der Literatur bekannt ist). Einige Embryonen weisen erst einen kleinen Spalt zwischen den Blastomeren auf, während andere bereits über eine das Zentrum des Embryos einnehmende Höhle verfügen. Das immunhistochemische Leptinverteilungsmuster (Abb. 24) entspricht prinzipiell dem für frühe Morulae beschriebenen. Die bereits beschriebenen zwei signaldichten Ringe zeigen sich auch im vorliegenden Präparat: zum einen in der innersten Lage der Mukoproteidschicht an der Grenze zur Zona pellucida (blauer Pfeil), zum anderen entlang der Blastomerenoberfläche. Letzterer ist in dieser Altersstufe zu einem Kreis an der Grenze zur Zona pellucida verstrichen, weil im Rahmen der Expansion der Blastozystenhöhle die Blastomeren gegen die Zona pellucida gepresst werden und somit der perivitelline Raum verstreicht. Die halbmondförmige Fluoreszenz unterhalb der apikalen Zellmembran der äußeren Blastomeren ist in der Mehrzahl der Schnitte dieser Altersstufe weniger deutlich zu erkennen.

Die Leptinverteilung ändert sich auch in der folgenden Entwicklung nicht (Abb. 25). Weiterhin dominiert die starke Fluoreszenz entlang der Oberfläche der äußeren Blastomeren zur Zona pellucida hin. Mit zunehmender Expansion der Blastozystenhöhle wird in einigen Embryonen die innere Zellmasse gut gegenüber dem Trophoblasten abgrenzbar. Die inneren Zellen zeigen im Vergleich mit dem Trophoblasten nur wenig Fluoreszenz.

Auch für 69 und 80 Stunden alte Embryonen werden Negativkontrollen mit PBS, Schafserum und Leptin-präabsorbiertem Erstantikörper durchgeführt. In jedem Fall folgt die Inkubation mit dem Zweitantikörper wie beim Hauptversuch. In den beiden erstgenannten Fällen ist es bisweilen schwierig, den fast nicht fluoreszierenden Schnitt überhaupt wiederzufinden. Bei gleichen Scanparametern ist diese Kontrolle schwarz. Bei Inkubation mit präabsorbiertem Leptinantikörper ist das Signal entlang der Oberfläche der

äußeren Blastomeren zum (ehemaligen) perivitellinen Spalt hin sowie das halbmondförmig unterliegende zytoplasmatische Signal nicht vorhanden, der helle Ring in den inneren Mukoproteidschichten abgeschwächt (spezifisches Signal). Dagegen bleibt das Signal im Zytoplasma und in den äußeren Lagen der Mukoproteidschicht vergleichbar stark (unspezifisches Signal).

Die dreidimensionale Rekonstruktion der Embryonen aus histologischen Realschnitten ist nicht mit der CLSM-Software möglich, da diese nicht auf das Importieren von extern generierten Bilddaten ausgelegt ist. Stattdessen erfolgte sie mit der Amira Software. Da die Semidünnschnitte nicht in gleicher Orientierung auf dem Objektträger montiert werden können und daher alle in verschiedener Orientierung aufgenommen werden, müssen sie vor der Rekonstruktion gedreht werden. Hierzu dienen markante Blastomeren oder die meist noch asymmetrische Blastozystenöhle als Landmarken, von denen aus zu den Polen dann die Schnitte orientiert werden. Die Blastozystenöhlen werden vor der Rekonstruktion durch digitale Bildmanipulation entfernt. Wichtig ist, den Abstand zwischen zwei Realschnitten zu kennen, schon beim Sammeln der Schnitte am Ultramikrotom also die Abfolge festzuhalten. Für die Schnittserien wird dann exakt jeder vierte Schnitt einer Leptin-Immunhistochemie zugeführt. Bei einer Schnittdicke von 0,75 µm ergibt sich daher ein Abstand von 3 µm zwischen zwei Schnitten. Diese Distanz wird der Rekonstruktionssoftware vorgegeben.

Abbildung 26 zeigt die dreidimensionale Rekonstruktion eines 69 Stunden alten Kaninchenembryos. Rote und gelbe Achse definieren die Ebene, in der die einzelnen Schnitte aufgenommen sind, die blaue Achse entspricht der rekonstruierten Dimension. Der recht homogene Farbeindruck ergibt sich zum einen durch die Tatsache, dass bei der Rekonstruktion zwischen nur dünnen Schichten relativ große Zwischenräume interpoliert werden, zum zweiten aber auch durch die nach außen ja relativ homogene Färbung der Schnitte. Ein leptinarmer oder –reicher Pol tritt in keiner Weise in Erscheinung, was in Kenntnis der Verteilungsmuster in den einzelnen Schnitten (s.o.) auch nicht zu erwarten gewesen wäre.

3.3.3 Zytokeratindarstellungen

Ähnlich wie bei Ganzpräparaten stellt sich auch am histologischen Realschnitt der Zytokeratinnachweis wegen der schwachen und in der Entwicklung erst spät positiv werdenden Reaktion als schwierig heraus (Abb. 27). Die der Reaktion zugehörige Positivkontrolle (Zytokeratinnachweis am Kaninchenuterus) ist bereits beschrieben

worden und in Abbildung 19 dargestellt. An der expandierten Blastozyste (96 Stunden) gelingt der Zytokeratinnachweis zuverlässig und reproduzierbar. Während der murale Trophoblast sowie der Trophoblast im Bereich der Rauberschen Deckschicht ein zartes filamentäres Signal aufweist, ist in der ICM keine Fluoreszenz detektierbar. Abbildung 27a zeigt zur besseren Orientierung den HE-gefärbten Semidünnschnitt einer 96h alten Blastozyste. In frühen Blastozysten (80 Stunden) und Morulae mit Spalt (69 Stunden) tritt ein noch schwächeres Zytokeratinsignal auf. Während der größte Teil des Embryos nur unspezifisch diffus erscheint, findet sich an der dem Spalt bzw. der Höhle zugewandten Membran der innen gelegenen Blastomeren ein distinktes Signal. Auch die äußeren Blastomeren zeigen (allerdings noch schwächer als die inneren) ein bescheidenes Signal zur sich bildenden Höhle hin. Der Verdacht, dass es sich hier um einen Randeffectartefakt handelt, liegt nahe, doch ist stets nur die dem Spalt zugewandte Membran betroffen, nicht aber die apikale Membran (die zu den Blastozystenwänden hinweist) oder interzelluläre Membranen.

Alle Negativkontrollen, die, wie für die vorangehenden Stadien beschrieben, im Einsatz von unspezifischen Mausantikörpern statt des (ebenfalls aus der Maus stammenden) Erstantikörpers bestehen, zeigen kein Signal (Abb. 27).

4. Diskussion

Zur besseren Verständlichkeit der folgenden Kapitel sollen zunächst einige Grundbegriffe der frühen Embryologie kurz anhand des Schemas in Abbildung 28 rekapituliert werden: Im Zygotenstadium wird der animale Pol durch die Position des zweiten Polkörperchens definiert. Dem gegenüber liegt dann vereinbarungsgemäß der vegetative Pol. Animaler und vegetativer Pol werden durch die Animal-Vegetative-Achse (A-V-Achse) verbunden. Im Blastozystenstadium wiederum wird der embryonale Pol durch die Position der ICM definiert. Diesem liegt dann der abembryonale Pol gegenüber. Durch beide Pole führt die Embryonal-Abembryonal-Achse (Emb-Ab-Achse). Eine feste Lagebeziehung der beiden Achsen (im Schema in Abbildung 28 stehen sie senkrecht aufeinander) wurde bis vor Kurzem nicht angenommen, wird aber diskutiert (s. folgende Diskussion). Diese Arbeiten, die experimentell-entwicklungsbiologischer Natur sind, visualisieren diese Achsen allerdings nicht direkt sondern lassen nur indirekt auf ihre Bildungsweise schließen. Daher ist eine direkte histochemische Darstellung von evtl. vorhandenen Asymmetrien die solche Achsen vielleicht schon anhand von Vor-Mustern in ihrer Entstehung anzeigen könnten, von großem Interesse.

Die Hauptergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich vereinfachend wie folgt zusammenfassen: Die immunhistochemische Leptindarstellung am Ganzpräparat eines präimplantativen Kaninchenembryos zeigt bei Untersuchungen im CLSM eine asymmetrische Leptinverteilung. Der präsumptive Trophoblast ist mit Betonung eines subplasmalemalen Halbmondes stärker gefärbt als die innere Zellmasse. Die dreidimensionale Rekonstruktion des Embryos zeigt eine leptinarme und eine leptinreiche Domäne innerhalb der Gesamtpopulation der oberflächlich liegenden Blastomeren, d.h. der präsumptiven Trophoblastzellen. Bettet man demgegenüber den Embryo in Epon ein und führt eine Immunhistochemie am Schnittpräparat durch, so lässt sich zwar eine zirkuläre Markierung des präsumptiven Trophoblasten (mit Maximum der „apikalen“, dem Perivitellinraum zugewandten Plasmamembranregion), nicht aber eine leptinreiche Domäne nachweisen. Zudem zeigen sich die in diesem Ansatz ja nicht abgedauten Hüllen teilweise ebenfalls markiert.

Da unter den experimentell-entwicklungsbiologisch arbeitenden Gruppen der Streit um die der frühembryonalen Achsenbildung zugrundeliegenden Mechanismen andauert (Zernicka-Goetz 2004 vs. Motosugi et al. 2005, ausführliche Diskussion unter 4.13 ff.), kommt der Frage, ob die CLSM-Asymmetriebefunde (s. Antczak und Van Blerkom 1997 und 1999, vorliegende Arbeit) aussagekräftig sind oder auf Artefakten beruhen, hohe Bedeutung zu. Es muss daher eine methodisch-kritische Diskussion erfolgen, um die unterschiedlichen Ergebnisse der Verfahrensweisen zu werten.

4.1 Penetrationsartefakte bei Ganzpräparaten

Die homogene immunhistochemische Anfärbung eines dreidimensionalen Präparats setzt neben der Gleichverteilung des Antigens auch ein adäquates Erreichen aller Antigenorte durch Erst- und Zweitantikörper voraus. Bei dicken Präparaten ist dies nicht trivial.

Zur Optimierung der Penetration der relativ großen Antikörpermoleküle, die für eine Immunhistochemie benötigt werden, stehen verschiedene Strategien zur Verfügung: Zunächst ist ein vollständiger Abbau der Blastozystenwänden anzustreben. Unabgedaute Blastozystenwändenreste behindern den Zugriff der Antikörper zum Embryo und färben sich überdies selbst an. Ferner sind Zellmembranen für Antikörper nicht permeabel. Detergenzien wie z.B. Triton X-100 zerstören das Membrangefüge teilweise („durchlöchern die Zellmembran“), was diese dann auch für Antikörper passierbar macht. In den vorliegenden Protokollen waren mit Triton X-100 und Igepal (je 0,1%) zwei der häufigst eingesetzten Detergenzien zum Einsatz gekommen. Schließlich stehen auch mit der Zeit und der Temperatur der Inkubation der Antikörper zwei Einflussgrößen zur Verfügung. Im vorliegenden Versuch erfolgte die Inkubation mit der Erstantikörperlösung

bei 4° Celsius über Nacht, die Zweitantikörperlösung wurde drei Stunden bei RT aufgetragen, d.h. es wurden bewusst relativ lange Penetrationszeiten gewählt. Zur Erkennung von eventuellen Penetrationsartefakten dienten in dieser Arbeit zwei Kontrolluntersuchungen:

4.1.1 Aktin

Die Verteilung des Aktins in präimplantativen Säugerembryonen ändert sich im Laufe der frühen Furchungsteilungen relativ stark, später nur noch wenig. Sie wurde von Albertini (Albertini et al. 1987) am Beispiel des Schweineembryos detailliert beschrieben. Die Autoren hatten dazu detergentextrahierte und fixierte Oozyten und Embryonen mit Rhodamin-Phalloidin gefärbt oder das Aktin immunhistochemisch angefärbt. Die Auswertung erfolgte fluoreszenzmikroskopisch. Während in Oozyten kein Aktin nachweisbar war, beschreiben die Autoren in Furchungsstadien eine beginnende Konzentration des Aktins im Blastomerenrandbereich, also dem Ort der zunehmenden Expression von Interzellularkontakten. Im Morulastadium zeigte sich dann eine homogene Färbung der Blastomeren mit gelegentlicher perinukleärer Betonung aber unter Aussparung der Kerne selbst. In der Blastozyste waren dann die Trophoblastzellen durch eine aktinreiche Zellperipherie gekennzeichnet, während in der ICM nur einzelne, vorwiegend der Blastozystenöhle zugewandte, Aktinanreicherungen zur Darstellung kamen.

Die Darstellung des filamentären Aktins mit Phalloidin hat in unseren Versuchen tatsächlich auch eine ähnliche, gleichmäßige Anfärbung in allen Blastomeren ergeben. Leider stand für die vorgelegten Versuche aber kein im Kaninchenmodell funktionierender Aktinantikörper zur Verfügung. Im Hinblick auf Artefakte, die durch unzureichende Penetration der Antikörperlösungen zu den inneren Blastomeren der Morula zustande kommen könnten, kann das Aktin-Phalloidin-TRITC-Signal aber nicht als Kontrolle gelten, da es sich nicht um eine Antikörper-vermittelte Markierung sondern um eine Färbung durch ein relativ kleines Molekül (Phalloidin) handelt. Andererseits haben wir beobachtet, dass das Aktin-Phalloidin-TRITC-Signal in Whole-Mount-Morulae ab einer Eindringtiefe von etwa 35µm artefaktisch abblasst. Das für Aktin als typisch erkannte Färbemuster (Kerne ausgespart, Blastomeren etwa homogen gefärbt) ist, in zunehmender Abschwächung, auch die die 35µm-Marke hinaus erhalten. Bezüglich der Eindringtiefeproblematik heißt das, dass das Fluoreszenzsignal des Leptinweitantikörpers bis in die Eindringtiefe als sicher verlässlich angesehen werden darf, bis zu welcher auch das TRITC-Signal etwa gleich stark verteilt ist. Dies erklärt, dass am lasernahen Pol des Embryos das detektierte Signal (sowohl Phalloidin-TRITC- wie

auch immunhistochemisches Signal) stets stärker ist und am laserfernen Pol artefaktisch abgeschwächt wird. Eine Ungleichheit zwischen Innen und Außen innerhalb desselben Schnitts, die in der Leptin-Immunhistochemie, nicht jedoch in der Aktindarstellung mit Phalloidin zu beobachten war, hingegen wird auf diese Weise nicht erklärlich.

Für die Leptinverteilung bedeutet das, dass unter den gegebenen Versuchsbedingungen (auch ohne Ansehen der Realschnitte) eine Aussage zu einer den Embryo umfassenden Polarität (leptinreicher bzw. –armer Pol) mit größter Zurückhaltung getroffen werden muss. Bei annähernd gleichen Versuchsbedingungen wie Antczak und Van Blerkom (1997) sie zugrunde gelegt hatten, haben auch wir Bilder für Leptin erhalten, die eine vergleichbare Polarität zeigen, für die Mechanismen der Entstehung der zur Darstellung kommenden Polarität müssen aber aus den genannten Gründen auch Artefakte in Betracht gezogen werden. Die Ursache dieser Artefakte ist in Anbetracht der hier vorgelegten Ergebnisse hauptsächlich im unzureichenden Eindringen des Lasers in den Embryo zu suchen.

4.1.2 Intermediärfilamente

Zum anderen dienten die Zytokeratinmarkierungen der Erkennung von eventuellen Penetrationsartefakten. Bei gleichem Reaktionsprotokoll findet sich hierbei je nach Stadium (s. Ergebnisteil) kein oder nur wenig Signal im Bereich der Blastomerenoberfläche, die ja am wenigsten von Penetrationsartefakten betroffen sein dürfte. Signal -wenn auch sehr dezent- liefern dagegen im Inneren der Morula gelegene Zytoplasmaareale. Daraus darf geschlossen werden, dass Penetrationsartefakte bei der Entstehung dieses Signals keine Rolle spielen dürften. Der Nachweis von Intermediärfilamenten bei präimplantativen Embryonen ist ein umstrittenes Thema. In den vergangenen etwa 20 Jahren sind widersprüchliche, Ergebnisse hierzu veröffentlicht worden. Im Rahmen dieser Arbeit schlugen alle Versuche, schon am 56h alten Kaninchenembryo einen Zytokeratinnachweis zu führen, fehl. Dieses Resultat fügt sich aber ein in eine Reihe von Befunden an anderen Säugerspezies, die ebenfalls keine Zytokeratinpositivität vor dem späten Morula- oder Blastozystenstadium finden konnten (Emerson 1988; Jackson et al. 1980; Reima et al. 1993) ein. Andere Autoren haben allerdings an diversen Spezies auch in früheren Stadien Zytokeratine nachweisen können (Chisholm und Houlston 1987; Klymkowsky et al. 1987; Lehtonen et al. 1983; Oshima et al. 1983; Plancha et al. 1989).

Die ersten im Mausembryo nachweisbaren Intermediärfilamente sind aber offenbar in der Tat Zytokeratine (Jackson et al. 1980). Sie konnten hier elektronen- und immunfluoreszenzmikroskopisch in den äußeren Zellen der Morulae nachgewiesen

werden. Ihr Auftreten im späten Morulastadium steht in zeitlichem Zusammenhang mit dem Nachweis von Desmosomen. Andere Autoren (Oshima et al. 1983) konnten die Zytokeratin-Antigene Endo A und Endo B mit einer zweidimensionalen Gelelektrophorese bereits in 4- und 8-Zellern der Maus nachweisen. Die Autoren führen den früheren Nachweis als bei Jackson (et al. 1980) auf die ihrer Auffassung nach sensiblere Methodik zurück. Immunhistochemisch zeigten Oshima et al. Zytokeratine in zuvor kultivierten Blastozysten. Hier färbte sich nur der Trophoblast. Emerson (1988) wies ebenfalls immunhistochemisch Zytokeratine im Mausembryo nach. Wenige Filamente waren ab dem 8-Zell-Stadium identifizierbar. Im Blastozystenstadium beschränkte sich der Nachweis auf die Trophoblastzellen. Emerson erweiterte die beschriebenen Versuche um die intrazelluläre Mikroinjektion von Anti-Zytokeratin-Antikörpern in Zweizeller. Dies verhinderte die Ausbildung der sonst nachweisbaren Zytokeratinnetzwerke. Dennoch entwickelten sich in vitro morphologisch normale Blastozysten. Der Autor folgert, dass die Zytokeratine für das Voranschreiten der frühen präimplantativen Entwicklung nicht nötig sind. Im Goldhamster wurden Zytokeratine ebenfalls elektronen- und immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht (Plancha et al. 1989). Die Autoren zeigten von der Oozyte an die Anwesenheit von Zytokeratinen, wobei sich die Verteilung im Laufe der Entwicklung änderte. In der Oozyte durchzogen die Zytokeratinfilamente netzwerkartig das Zytoplasma. Nach der Fertilisation konzentrierte sich der Nachweis dann zunehmend auf die kortikalen Zytoplasmaareale. Auch CLSM-Untersuchungen von Intermediärfilamenten sind in den 1990er Jahren durchgeführt worden: Während filamentäres Vimentin in frühen Mausembryonen nicht nachgewiesen wurde, sind Zytokeratine ab dem 8-Zell-Stadium vorhanden. In der Blastozyste findet man sie im Trophoblasten (Coonen et al. 1993). In der gleichen Studie durchgeführte Immunfluoreszenzassays mit spezifischen Antikörpern haben gezeigt, dass besonders die Zytokeratine 8 und 18, weniger auch 7 und 19, frühembryonal exprimiert werden. Zusammenfassend muss geschlossen werden, dass Zytokeratine beim Kaninchen spät exprimiert werden, evtl. später als bei der Maus, und dass ihre immunhistochemische Nachweisbarkeit erst nach der morphologisch manifesten Differenzierung des Trophoblasten (d.h. erst im Blastozystenstadium) beginnt. Daher eignen sich die Zytokeratine beim Kaninchen weder als Positivkontrolle zur Antikörper-Eindringtiefenproblematik noch zur Untersuchung von evtl. histochemischen Unterschieden zwischen Blastomeren während der Furchung.

4.2 Artefakte bei CLSM-Untersuchungen

Bei allen ausgewerteten Ganzpräparaten (gleich, welcher Antikörper verwendet wurde oder ob Phalloidin-TRITC eingesetzt wurde) fiel auf, dass ab einer Eindringtiefe von etwa

35µm das detektierte Signal schwächer wurde. Zum einen scheint die Unterstellung, dass schon beim Montieren des Embryos auf dem Objektträger eine präexistierende (aber morphologisch nicht erkennbare) signalreiche Domäne immer ungewollt lasernah orientiert worden sei, abwegig, zum anderen konnte auch an den Realschnitten (siehe Kapitel 3.3.1 und 3.3.2) eine den Embryo als Ganzes umfassende Polarität nicht gezeigt werden. Es ist wahrscheinlich, dass diese Abschwächung ab etwa 35 µm Tiefe auf eine zunehmenden Abschwächung des Lasersignals im Gewebe zurückzuführen ist.

Über die eindringtiefenbedingte Signalabschwächung hinaus sind weitere Mechanismen bekannt, die zu artefaktischer Reduktion des detektierten Signals führen können:

1. „Photobleaching“: Hierunter versteht man die meist irreversible Zerstörung von Fluorochrommolekülen. Im Gegensatz zum klassischen „Ausbleichen“ etwa einer Fotografie tritt das Phänomen bei vielen Fluorochromen relativ rasch und deutlich auf. Es ist abhängig von der Intensität der einwirkenden (Laser)-Strahlung, der Einwirkdauer und der Stabilität des Fluorochroms.
2. „Quenching“: Darunter versteht man die Auslöschung von Fluoreszenz durch molekulare Interaktionen, wobei das Emissionsspektrum des Fluorochroms nicht verändert wird. Zu unterscheiden sind statisches Quenching (Moleküle bilden Komplexe) und dynamisches Quenching (durch Kollision). Weiterhin differenziert man in Quenching durch Fremdmoleküle („Quencher“) und self-quenching, wobei Fluorochrommoleküle sich gegenseitig intermolekular oder zwischen verschiedenen Domänen ein und desselben Moleküls auslöschen.
3. Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET): Energietransfer zwischen zwei (Fluorochrom-) Molekülen, wobei ein durch Licht der Wellenlänge X angeregtes Fluorochrom seinerseits Licht der Wellenlänge Y freisetzt, das wiederum ein unmittelbar benachbartes anderes Fluorochrom anregt. FRET ist daher entfernungsabhängig. Bei gleichzeitiger Anwendung mehrerer Fluorochrome im Rahmen einer IHC kann FRET zur Abschwächung des von einem Fluorochrom emittierten Lichts und so zu einer unvorteilhaften Verfälschung des detektierten Signals führen.
4. Excimer-Bildung: Excimer sind Dimere der angeregten Stadien eines Fluorochroms. Diese Dimere haben ein gegenüber den Monomeren verändertes Emissionsspektrum.

Über diese prinzipiellen Mechanismen hinaus treten bei der CLSM dreidimensionaler Objekte besondere Tücken auf: Die Kugelgestalt des Embryos bringt es mit sich, dass anregende sowie emittierte Strahlen, die das Zentrum der Kugel erreichen/verlassen, einen weiteren Weg durch Zellmaterial zurückzulegen haben als den Rand treffende Strahlen, so dass hier eine größere Zahl der genannten molekularen Effekte, die die

Intensität des Fluoreszenzsignals beeinflussen, ablaufen können. Durch höhere Ausgangsleistung der Laser lässt sich dieses Problem zwar verkleinern, doch erkaufte man sich das durch verstärktes Bleaching, was bei ohnehin geringer Signalintensität (und davon muss bei Leptin ausgegangen werden) das Präparat noch innerhalb eines Scanvorgangs ausbleichen kann. Zwar handelt es sich bei Blastomeren der präimplantativen Embryonen des Kaninchens und der Maus um relativ wenig dichte Zellen (d.h. viel Grundzytoplasma, wenig Membranen), doch wird der Abschwächungseffekt nicht eliminiert.

Der Frage nachgehend, bis zu welcher Eindringtiefe denn verlässliche Aussagen im vorliegenden Fall überhaupt möglich sind, liefert die Aktin-Phalloidin-TRITC-Markierung wertvolle Anhaltspunkte. Bis an die 50µm-Marke heran kommt eine aktintypische Verteilung (filamentär, Kerne ausgespart vgl. Albertini et al. 1987) ohne Asymmetrien zur Darstellung. Erst jenseits davon verblasst auch hier die Fluoreszenz bei einem relativ geringen Innen-<Außen-Gradienten. Das Problem des Fluoreszenzverlusts ab bestimmten Eindringtiefen ist von verschiedenen Autoren systematisch angegangen worden. Mathematische Korrekturformeln („Attenuation correction“) konnten für theoretische in-vitro-Modelle entwickelt werden (Anderson et al. 2003; Eidsath et al. 2002; Kervrann et al. 2004; Laurent et al. 1994; Markham et al. 2001; Rigaut und Vassy 1991; Wartenberg und Acker 1995). Aufgrund der angeführten Gründe (s. Kapitel 2.1 und 4.3) ist die Zahl der zur Verfügung stehenden präimplantativen Kaninchenembryonen stark limitiert, sodass sie sich als Untersuchungsobjekt für eine methodisch-kritisch orientierte CLSM-Studie nicht eignen. Zur statistischen Analyse wäre eine artefizielle, homogen bzw. ungleichmäßig gefärbte, Kugel ein geeignetes Objekt.. In der vorliegenden Arbeit ist aber versucht worden, den ja vorliegenden (Antczak und Van Blerkom 1997 und 1999) CLSM-Befunden dadurch Rechnung zu tragen, dass vergleichende Untersuchungen mit einem anderen methodischen Ansatz gegenübergestellt werden, d.h. der Immunhistochemie am histologischen Realschnitt. Dieses Vorgehen eliminiert die Problematik der Eindringtiefenartefakte, so dass aus dem Vergleich beider Datensätze eventuell auf Artefakte in den CLSM-Ergebnissen zurückgefolgert werden kann.

4.3 Technische Problematik der Vorbereitung der Embryonen für die Whole-Mount-Versuche

Die Vorbehandlung der Kaninchenembryonen für die Whole-Mount-Immunhistochemie ist ein diffiziles Unterfangen. Grundvoraussetzung ist die Entfernung der den Keim umgebenden Mukoproteidschicht, welche für größere Moleküle eine (von verschiedenen Parametern einschließlich der Ladung abhängige) Barriere darstellt (Denker 2000). Dazu

stehen prinzipiell zwei Möglichkeiten zur Wahl: die rein mechanisch-mikromanipulatorische „Enthüllung“ der Embryonen oder ein partieller enzymatischer Abbau der Hüllen mit mechanischer Unterstützung. Die kombiniert mechanisch-enzymatische Abbauprozedur ist zwar, wenn sie gelingt, geeignet, die Embryonen von ihrer Hülle zu befreien, kann aber auch dazu führen, dass sie bei zu intensivem Einwirken in ihre Blastomeren zerlegt werden. Umgekehrt lieferte aber ein nicht unerheblicher Teil von 25 (von insgesamt 67) Embryonen keine verwertbare Aussage, da unvollständig abgedaute Hüllen oder Kristallbildung an solchen Hüllenresten die Fluoreszenz empfindlich störten. Diese Störfaktoren wären durch Intensivierung der Abdauung (längere Pronaseeinwirkzeit) reduzierbar, doch nimmt dann der Totalverlust an Embryonen durch Zerfall während des Protokolls zu. Auch muss man bei vollständigem Abbau der Keimhüllen mit Antigenitätsverlust der Zelloberflächen rechnen, weswegen eine unvollständige Lyse mit nachfolgender mechanischer Ruptur der Hüllen (forciertes Pipettieren) angestrebt wurde. So bewegt sich der Experimentator auf einem engen Grat, auf dessen einer Seite der Erhalt des Embryos in noch nicht verwertbarem Zustand (zu dicke Hüllenreste), auf der anderen Seite aber sein Verlust steht, und nur einige der Embryonen überstehen die Prozedur ohne Schäden.

Ich habe mich für eine kombiniert enzymatisch-mechanische Abbauprozedur entschieden, da sie weniger mechanischen Stress auf den Embryo ausübt. Der Abbau der Hüllen (siehe Material und Methoden) bleibt aber ein sehr kritischer Arbeitsschritt, an dem sich nicht selten der Erfolg des gesamten Experiments entscheidet. Ein besonderes Problem besteht in der enormen Adhäsivität der angedauten Hüllen. Diese führt dazu, dass die Embryonen an der Gefäßwand und mehr noch an der Innenseite der gläsernen Pasteurpipette kleben bleiben. Beim Versuch, durch forciertes Ein- und Auspipettieren die Hüllen vollständig zu entfernen, gehen Embryonen verloren. Entweder sie fragmentieren unter zu großem Sog, oder sie verschwinden am Gefäßrand oder in der Pipette. Belässt man andererseits geringe Reste der Hüllen, um die genannten Risiken zu umgehen und weil sie dem zerbrechlichen Embryo eine gewisse Stabilität verleihen, so neigen die klebrigen Hüllenreste dazu Kontaminationen (kleinste Kristalle) der folgenden Lösungen beständig an sich zu binden. Die adhärierenden Verunreinigungen fluoreszieren dann im CLSM bisweilen so sehr, dass eine aussagekräftige Beurteilung des Präparates unmöglich wird (s. Abbildung 13). Auch im weiteren Verlauf des Protokolls, bei dem jeder einzelne Embryo mittels einer Pasteurpipette von Lösung zu Lösung transferiert wird, treten immer wieder Verluste auf. Gerade bei der Inkubation mit den Antikörperlösungen, die aus Kostengründen nur als Tropfen appliziert werden können, verschwinden regelhaft Embryonen ohne erkennbare Ursache.

4.4 Allgemeines zu Leptin und seiner Rolle im Reproduktionsgeschehen

Leptin ist ein 167 Aminosäuren großes Peptidhormon, das in Adipozyten exprimiert wird und für die Regulation des Fettstoffwechsels von eminenter Bedeutung ist (Oberkofler et al. 1997). Einen Überblick über das das Leptin kodierende Obese Gene bzw. die molekulare Struktur des Leptins geben Gong (Gong et al. 1996) bzw. Kline (Kline et al. 1997). Von Leptin konnte nach seiner Identifizierung als Hormon im Rahmen der Stoffwechselregulation auch gezeigt werden, dass es in verschiedenen anderen Zusammenhängen, z.B. in der Reproduktionsbiologie und in der Karzinogenese (Mammakarzinoms: Markowska et al. 2004a; Markowska et al. 2004b) involviert ist.

Im Kontext der Reproduktionsmedizin ist es nicht nur in Präimplantationsstadien nachgewiesen worden, sondern wurde auch in den Granulosazellen des Ovars, der Follikelflüssigkeit und dem Uterussekret identifiziert (Antczak und Van Blerkom 1997; Craig et al. 2004; Kawamura et al. 2002). Die Blastozyste selbst scheint die Leptinexpression des Uterus, die im Falle einer Schwangerschaft deutlich erhöht ist (Gonzalez et al. 2000a; Kawamura et al. 2002), zu steuern. Die Anwesenheit von Leptin im Uterusmilieu scheint für die Entwicklung des Embryos von Bedeutung zu sein, wie einige In-vitro-Studien nahelegen, bei denen Embryonen mit und ohne Leptinzusatz kultiviert wurden (Craig et al. 2004; Kawamura et al. 2003). Dem wird allerdings von anderen Autoren widersprochen: Swain et al. (2004) fanden bei Inkubation von Mauszygoten in Medien mit wechselndem Leptingehalt weder eine Beeinflussung des Ablaufs der Furchungsteilungen noch der Blastomerendegenerationsrate oder der Blastozystenentwicklung bis zum 96 Stunden-Stadium. Schulz und Widmaier (2004) konnten zeigen, dass Leptin in bestimmten Konzentrationen die Invasivität von Trophoblastzellen erhöht, so dass es eine Bedeutung im Rahmen der Implantation des Embryos haben könnte. Dieser Effekt ließ sich durch Zusatz von Metalloproteinaseinhibitor unterbinden, was die Autoren veranlasste zu folgern, dass Leptin seine Wirkung über Metalloproteinasen vermittelt. Weiterhin scheint Leptin auch bei der männlichen Keimzellentwicklung eine Rolle zu spielen: El-Hefnawy (2000) konnten den Rezeptor OB-R in Mausehodien nachweisen. Cervero et al. (2005) entwickelten auch die Hypothese, dass die im Blastozystenstadium einsetzende embryoeigene Leptinproduktion und -sekretion die Rezeptivität des Endometriums steigert und so die Implantation vorbereitet. Diese Überlegung stützt sich u.a. darauf, dass andere Autoren wohl OB-R-, nicht aber Leptin-mRNA im Endometrium nachweisen konnten (Alfer et al. 2000). Yoon et al. (2005) zeigten, dass bei Mäusen der Leptinrezeptor mehr in den Stromazellen des Uterus exprimiert wird als in Epithelzellen, ferner, dass an Implantationsstellen die Expression gegenüber den Interimplantationsstellen herunter

reguliert wird. Es verdichten sich also Hinweise, dass das Leptin/Leptinrezeptor/Stat3-System in der Kommunikation von Uterus und Embryo eine Rolle spielt. Hypothesen zur Bedeutung dieser Interaktion wurden in der Literatur jedoch bisher nicht aufgestellt.

4.5 Leptin in präimplantativen Embryonen

Die Arbeitsgruppe Antczak und Van Blerkom hatte 1997 erstmalig Daten über die immunhistochemische Lokalisation von Leptin und Stat3 in präimplantativen Embryonen bei Mensch und Maus publiziert. Menschliche Embryonen wurden im Rahmen von In-vitro-Fertilisationen, Mausembryonen aus ovulationsstimulierten schwangeren Tieren gewonnen. Nach Entfernung der Zona pellucida (saure Tyrode-Lösung und mechanisch) wurde eine Whole-Mount-Immunhistochemie für Leptin und Stat3 durchgeführt. Die Auswertung der Ganzpräparate erfolgte mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie (CLSM). Beide Proteine konnten bei Mensch und Maus von der Oozyte an bis zum Blastozystenstadium detektiert werden. In den Abbildungen 29 bis 32 sind Illustrationen aus der Arbeit Antczak und Van Blerkom 1997 reproduziert. In vielen Punkten ist die Ähnlichkeit der Befunde mit denen, die in der hier vorgelegten Arbeit mit der entsprechenden Methodik an Ganzpräparaten des Kaninchens erhoben wurden, augenfällig (vgl. Abbildungen 5-12).

Abbildung 29 zeigt eine solche Darstellung der Leptin-Immunhistochemie an der Mauszygote nach Antczak und Van Blerkom (1997). Das 2. Polkörperchen liegt innerhalb der leptinreichen Domäne (im Falschfarbencode weiß) und ist selbst leptinreich. Antczak und Van Blerkom beschreiben dies als reproduzierbaren Befund bei der Maus. Bei Mensch und Kaninchen ist das Polkörperchen in der Regel nicht darstellbar. Abbildung 30 zeigt einen wiederum anti-Leptin gefärbten Zweizeller der Maus. [B] ist ein virtueller optischer Schnitt durch die Mitte des Präparates (also das, was das CLSM als Datenrohwert generiert), [C] die aus 3D-Rekonstruktion mehrerer Schnitte resultierende Projektion. Das zweite Polkörperchen kommt hier in der Furche der Blastomeren zu liegen. Im Rahmen der weiteren Furchungsteilungen wird die leptinreiche Domäne auf die Blastomeren segregiert. Abbildung 31 zeigt einen virtuellen Schnitt durch eine frühe menschliche Morula. Die leptinreiche Domäne ist durch zwei Pfeile zusätzlich markiert. Schon in der Morula zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen Blastomeren mit einem starken Leptinsignal und solchen mit einem schwachen. Dies wird von Antczak und Van Blerkom als unterschiedliche Markierung der präsumptiven Embryoblast- und Trophoblastzellen gedeutet, da im nachfolgenden Blastozystenstadium der Embryoblast bzw. die innere Zellmasse schwach, der Trophoblast am gegenüberliegenden Pol aber stark reagiert (Abb. 32). Die leptinreiche Domäne kommt dabei im muralen

abembryonalen Trophoblasten zur Projektion. Das in der vorliegenden Arbeit gewählte methodische Vorgehen lehnt sich im ersten Teil der Versuche bewusst an Antczak und Van Blerkom an. Wesentlichster Unterschied besteht in der gewählten Spezies. Das Kaninchen wurde deshalb gewählt, weil Versuche mit menschlichen Embryonen unzulässig sind, kleinere und handhabbarere Versuchstiere wie die Maus in ihrer Frühentwicklung von der menschlichen aber zu verschieden sind. Bei der Maus beginnt z.B. die Expression des zygotischen Genoms viel früher, die Oozyten und frühen Embryonen sind nur halb so groß, und es kommt nach der Blastozystenbildung zur Einstülpung des Embryos im Sinne eines Zylinders. Die Bildung einer flachen Keimscheibe, wie bei Mensch und Kaninchen bleibt daher aus (Denker 1983). Unerfreulicherweise ist allerdings das Spektrum im Kaninchenmodell funktionierender Antikörper für immunhistochemische Untersuchungen viel geringer als in anderen Spezies.

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten CLSM-Befunde zur Verteilung des Leptins in Ganzpräparaten von präimplantativen Kaninchenembryo entsprechen den von Antczak und Van Blerkom (1997) für Maus und Mensch gezeigten in den geschilderten Hauptbefunden der asymmetrischen Leptinverteilung. Im Einzelnen entsprechen sich die Kernaussagen dieser Whole-Mount-Experimente darin, dass

- erstens immunhistochemisch nachweisbares Leptin im präimplantativen Säugerembryo vorhanden ist,
- zweitens es überwiegend in peripheren Anteilen des Zytoplasmas der oberflächlich gelegenen Blastomeren von Furchungsstadien lokalisiert ist,
- drittens es innerhalb der äußeren Blastomeren maximal nahe der dem perivitellinen Spaltraum benachbarten Membran (PVS) auszumachen ist,
- viertens bei dreidimensionalen Rekonstruktionen der CLSM-Scans von Morulae ein leptinarmes und ein leptinreiches Pol der Morula zur Darstellung kommt.

Betrachtet man die Leptinverteilung genauer, so fällt auf, dass das Signal besonders oberflächen-gebunden ist und weiterhin, dass die leptinreiche Domäne meist große Teile der Zirkumferenz des Embryos einnimmt. In der Falschfarbendarstellung werden geringfügige Unterschiede überbetont, sodass der Eindruck eines Gradienten besonders in der 3D-Rekonstruktion (vgl. Abbildung 12) sehr sinnfällig wird. Die oftmals verwandten Farbcodes, die Unterschiede im Bereich von Zehnerpotenzen suggerieren, täuschen den Betrachter hier. Mehrere Autoren haben gefordert, der Tatsache Rechnung zu tragen, dass die Konzentration (und damit auch evtl. Gradienten) von morphogenetischen Faktoren typischerweise nur sehr gering sind. Solche feinen Unterschiede können

vielleicht, müssen aber nicht zwangsläufig, morphogenetisch relevant sein. Darüber kann nur das entwicklungsbiologische Experiment Aufschluss geben, sodass man bei Rückschlüssen, die sich allein auf diskrete histochemische Konzentrationsunterschiede gründen, vorsichtig sein sollte (vgl. Denker 1970), insbesondere wenn diese lokalen Unterschiede durch den Kunstgriff der elektronischen Verstärkung überbetont werden.

Die IHC an eponeingebetteten Embryonen hat sich im Gegensatz zu den Ganzpräparaten unzweifelhaft gezeigt, dass die Leptinverteilung innerhalb eines realen Schnitts einer Morula radiärsymmetrisch ist. Das starke Signal entlang der PVS-Oberfläche der äußeren Blastomeren weist bei diesen Realschnitten in keinem der untersuchten Stadien eine Bevorzugung eines Areal der Morulaoberfläche, also eines Pols, auf. Konsekutiv ergibt sich auch in der 3D-Rekonstruktion aus diesen Realschnitten kein Anzeichen für einen den Embryo überspannenden Gradienten (vgl. Abbildung 26). Es besteht kein Grund zu der Annahme, dass das uniforme Erscheinungsbild der Leptin-IHC am histologischen Realschnitt artefaktischen Ursprungs ist.

In Anbetracht der möglichen Artefaktquellen bei der Gewinnung und Auswertung der CLSM-Bilder ist dem homogenen Färbemuster der Realschnittserien hohe Bedeutung beizumessen. Daher ziehe ich die Schlussfolgerung, dass aus den zur Verfügung stehenden Daten ein die Kaninchenmorula umfassender Gradient im Sinne eines leptinarmen und –reichen Pols nicht postuliert werden kann. Vielmehr müssen die im Rahmen der vorliegenden Arbeit und damit, wegen der analogen Technologie, auch die durch die Arbeitsgruppe Antczak und Van Blerkom erzeugten CLSM-Resultate an präimplantativen Ganzpräparaten als artefaktbelastet und bezüglich ihrer Hauptaussage zweifelhaft angesehen werden. Bei der Diskussion der CLSM-Resultate kann die bemerkenswerte Tatsache, dass Antczak und Van Blerkom in einer weiteren Publikation (Antczak und Van Blerkom 1999) noch für weitere Proteine (Bax, Bcl-x, transforming growth factor beta 2 [TGF beta 2], vascular endothelial growth factor [VEGF], c-kit und epidermal growth factor R [EGF-R]) ein ganz ähnliches Verteilungsmuster nachgewiesen haben (E-Cadherin war allerdings bei gleichem Versuchsaufbau homogen verteilt), nicht ohne Erwähnung bleiben. Es ist dabei zu bedenken, dass es sich hierbei um Proteine handelt, die in der Zelle zum Großteil in diffusibler Form vorliegen. Entweder sind tatsächlich all diese Proteine in ähnlicher Weise polarisiert verteilt, dann stellt sich die Frage, welche strukturellen Besonderheiten des Zytoplasmas (z.B. im Bereich der nicht diffusiblen Zytoskelettanteile) oder der Membran diese Gradienten bedingen und aufrecht erhalten oder es liegt hier ein systematisch auftretendes Artefakt vor.

Synopsis zu möglichen Artefakten und experimentellen Lösungsansätzen		
	Ganzpräparate - CLSM	Realschnitt
Unspezifische AK-Bindungen	Nicht beobachtet (mit Ausnahme von Hüllenresten)	z.T. gegeben → stringente Kontrolle durch Erstantikörper-Präabsorption
Hüllenreste behindern AK-Penetration	Möglichst vollständiges Abdauen	Entfällt, da AK-Anwendung am Schnitt
Asymmetrisch liegende angefärbte Hüllenreste täuschen Ungleichverteilung des zellulären Signals vor	Letztlich nicht ausgeschlossen, jedoch zeigen alle Leptin-Embryonen ein polares Signal	Entfällt, da Reaktion am Schnitt; Hüllen erweisen sich aber als eindeutig leptinhaltig
Signal schwächer bei zunehmender Eindringtiefe	Bis 35µm verlässliches Signal dann zunehmender Signalverlust (auch bei Phalloidin-TRITC-Markierung des Aktins); Problem bei 3D-Rekonstruktion: Z-Stapel	entfällt
Unbeabsichtigte Orientierung der Embryonen entsprechend einer präexistenten Achse bei der Einbettung	Nicht auszuschließen, da keine Landmarke, jedoch unwahrscheinlich, dass leptinreiche Domäne immer lasernah	entfällt
Ungleichmäßige Kunstharzentfernung	entfällt	Im einzelnen Schnitt evtl. Gradienten vortäuschend, bei Z-Stapel aber als Artefakt erkennbar da unsystematisch
Diffusibles Leptin schlägt sich bei Fixierung o.ä. an Blastomerenoberfläche nieder	Möglich	Möglich

Um der Frage nach einer systematischen Ursache für die Ungleichverteilung so vieler Proteine nachzugehen, untersuchten wir die Verteilung zytoskelettaler Elemente. Während die Zytokeratine aber in frühesten Furchungsstadien des Kaninchens immunhistochemisch noch nicht nachweisbar sind, war Aktin homogen verteilt, so dass sich eine unmittelbare Erklärung für eventuelle Asymmetrien hier nicht findet. Eine bei der Leptinimmunhistochemie in beiden Methoden gemeinsam zur Darstellung kommende Asymmetrie besteht in der Signalverdichtung entlang der apikalen Blastomerenmembran der äußeren Blastomeren. Zerlegt man diese Verdichtung gedanklich in zwei Komponenten (eine membranständige und eine submembranös intrazytoplasmatische), so scheint im Whole-Mount-Präparat die intrazytoplasmatische halbmondartige Leptinansammlung zu überwiegen, während im Realschnitt die dem PVS benachbarte Membran selbst besonders stark markiert ist. Unsere Versuche an geätzten Eponschnitten haben gezeigt, dass auch in den Blastozystenhüllen Leptin vorhanden ist. Die Fluoreszenz der äußeren Hüllenschichten wurde zwar als Artefakt identifiziert: Da sie auch in Ansätzen, die mit Leptin-präabsorbiertem Erstantikörper inkubiert worden waren, auftrat, muss sie auf eine unspezifische Protein-Protein-Interaktion zurückgeführt werden. Die starke Fluoreszenz einer inneren Lamelle der Hüllen (s. auch Ergebnisteil) dagegen erwies sich im gleichen Versuchsansatz als spezifisch. Es muss gefolgert werden, dass auch die Blastozystenhüllen Leptin enthalten, und zwar insbesondere die Grenzschicht zwischen Mukoproteidschicht und Zona pellucida (in geringerer Dichte auch die Zona pellucida selbst). Es kann daher nicht ganz ausgeschlossen werden, dass bei der partiellen Abdauung der Hüllen (die Leptin enthalten) für die Herstellung von Ganzpräparaten Hüllenreste verbleiben können und dass diese u.U. so auf der Blastomeren-Oberfläche liegen können, dass sie eine polare Anreicherung von Leptin in/an einer bestimmten Blastomere vortäuschen können.

4.6 Bedeutung der embryonalen Hüllen

Die embryonalen Hüllen (Abb. 4) (beim Kaninchen in Furchungsstadien bestehend aus der innen liegenden Zona pellucida und einer sich außen anschließenden Mukoproteidschicht) haben in den letzten Jahren zunehmend Interesse in der embryologisch-reproduktionsbiologischen Forschung gefunden. Die embryonalen Hüllen stellen eine besondere Art der extrazellulären Matrix dar und sind epithelialen Ursprungs (epitheliale Sekrete). Sie bestehen aus Glykoproteinen, sind aufgrund ihres hohen Gehalts an Sialinsäure und zahlreichen Sulfatgruppen stark negativ geladen und hydratisiert (Denker 1970a/b). Dies bedingt ein hohe unspezifische Proteinbindungskapazität der Hüllen. Sie erfüllen mehrere wichtige Funktionen: Zunächst sind sie (speziell die Zona pellucida) für die Spermium-Oozyten-Interaktion und

Akrosomreaktion von Bedeutung und verhindern Polyspermie, also das Eindringen mehrerer Spermien in eine Oozyte. Ferner schützen sie den Embryo vor schädigenden Einflüssen im Uterusmilieu, wie etwa Toxine, Bakterien, Viren oder Phagozyten (Herrler und Beier 2000). Vor der Kompaktierung müssen sie auch dem Embryo mechanische Stabilität geben. Für die geordnete Differenzierung der Zellen der Morula ist von Bedeutung, dass die Zona pellucida eine für die äußere Plasmamembran der oberflächlichen Blastomeren nicht-adhäsive Oberfläche bildet, damit diese, wenn sie zu Trophoblastzellen werden, ihre apiko-basale Polarität in regelrechter Ausrichtung ausbilden können. Auch für die extrazelluläre Matrix, die sich im perivitellinen Raum befindet, gibt es Hinweise auf eine morphogenetische Bedeutung (Denker 2000). Zur Implantation wiederum ist es erforderlich, dass die Hüllen der Adhäsion des Trophoblasten an das Uterusepithel nicht im Wege stehen, d.h. sie müssen beseitigt werden, damit sie das „Schlüpfen“ der Blastozyste nicht behindern. Der Mukoproteidschicht muss (besonders im Kaninchenmodell, wo sie sehr ausgeprägt ist) besondere Aufmerksamkeit gelten, da sich ihre Dicke und chemische Zusammensetzung im Laufe der präimplantativen Entwicklung ändern. Grundend auf der Beobachtung, dass die in frühen Blastozystenstadium fest-elastische Mukoproteidschicht im späten Blastozystenstadium rigide und (nach der Entwässerung) zerbrechlich wird, untersuchten Denker und Gerdes (1979) ihren Aufbau genauer und fanden, dass sich morphologischer Aufbau, Zusammensetzung und Ladungsverhältnisse im Laufe der Entwicklung in charakteristischer Weise ändern (Abbildung 33). Im Rahmen der Blastozystenexpansion dünnen Zona und Mukoproteidschicht so sehr aus, dass erstere ganz verschwindet und auch letztere z.T. nur noch elektronenmikroskopisch nachweisbar ist. Die Zona wird aber anschließend (etwa ab d 4,5) durch neues Material ersetzt („Neozona“). Auch von außen wird (dem Uterussekret entstammendes) Material aufgelagert, welches dem Erstbeschreiber Böving folgend als „Gloiolemma“ bezeichnet wird.

Die physikochemischen Eigenschaften der Hüllen (Herrler und Beier 2000; Turner 1997) bedingen eine Permeabilität für Moleküle bis zu einer Größe von etwa 200 kD. Abgesehen von der Molekülgröße sind auch die Hydro- bzw. Lipophilität und die van der Waals'schen Kräfte für die Penetration eines Moleküls durch die Hüllen von Bedeutung. Ferner ist interessant, dass eine Reihe von Molekülen in den Hüllen nachgewiesen werden konnten, die sich hier offenbar anreichern. P19 (Stewart et al. 1995) (ein 19 kD Protein, das im Uterusmilieu bei Pferden vorkommt) wurde in den embryonalen Hüllen nachgewiesen. Später wurde auch demonstriert (Crossett et al. 1998), dass es bei dieser Spezies von Trophoblastzellen aufgenommen wird. In ähnlicher Weise konnte gezeigt werden, dass der Insulin-like Growth Factor (IGF) (maternalen Ursprungs) die Hüllen

passiert, vom Trophoblasten aufgenommen und in die Blastozystenhöhle sezerniert wird und im Embryo möglicherweise stoffwechselaktivierend wirkt (mehrere Einzelautoren, reviewed bei Herrler und Beier 2000). Auch für den Heparin-binding Epidermal Growth Factor (HB-EGF) sind ähnliche Prozesse belegt (Kliem et al. 1998).

Zusammenfassend muss eine deutlich über den mechanischen Schutz des Embros hinausgehende Bedeutung der embryonalen Hüllen unterstellt werden. Herrler (Herrler und Beier 2000) bezeichnet sie gar als „Briefkasten“ in der Kommunikation von Uterusepithel und Embryo. Vor diesem Kontext muss auch der hier erbrachte Nachweis von Leptin in den embryonalen Hüllen diskutiert werden.

4.7 Herkunft des nachgewiesenen Leptins

Antczak und Van Blerkom (1997) hatten das Protein Leptin in Oozyten im Ovar und in Präimplantationsstadien immunhistochemisch nachgewiesen. Mehrere Arbeitsgruppen konnten in zum Teil sehr umfassenden Studien (Cervero et al. 2005; Kawamura et al. 2003; Kawamura et al. 2002) zeigen, dass in der Oozyte wie auch in Furchungsstadien bis hin zur Blastozyste Leptinrezeptor-(=OB-R-)mRNA nachweisbar ist. Das bedeutet, dass der Rezeptor während der gesamten Frühentwicklung exprimiert wird. Leptin-mRNA konnten dieselben Autoren in Embryonen aber erst ab dem Blastozystenstadium nachweisen. Zusammenfassend liegt daher die Annahme nahe, dass es sich bei dem immunhistochemisch nachweisbaren Leptin der präblastozystischen Stadien zunächst um maternales Protein handelt. Zur Herkunft des Leptins wäre neben der oozytären Segregation aber auch die Aufnahme aus dem Umgebungsmilieu denkbar, vor allem, da Leptin auch im Endometrium und im Uterus- und Tubensekret nachgewiesen worden ist (Cervero et al. 2005; Gonzalez et al. 2000b; Yoon et al. 2005). Wegen des Fehlens eines mRNA-Nachweises im Embryo liegt nahe, dass Leptin von Syntheseorten im mütterlichen Organismus humoral zum Uterus transportiert und in das Uteruslumen abgegeben werden könnte. Die hier vorgelegten Leptinnachweise am Eponsemidünnschnitt zeigten, dass auch die Embryonalhüllen Leptin enthalten und dass Leptin im Embryo selbst überwiegend entlang der dem PVS zugewandten Membran lokalisiert ist. Die Mukoproteidschicht hat eine hohe Proteinbindungskapazität (s.o.), so dass im Uterusmilieu befindliches Leptin (Kawamura et al. 2002) sich hier anreichern könnte. Anschließend könnte Leptin durch den perivitellinen Spaltraum und bis zur Oberfläche der äußeren Blastomeren gelangen.

Bei der Herstellung der Ganzpräparate könnte das Abdauverfahren und der Leptingehalt der Hüllen zur Entstehung eines Lokalisationsartefakts geführt haben: Leptin, welches

sich im perivitellinen Spalt oder an oberflächliche OB-R der äußeren Blastomeren gebunden ist, dürfte zumindest zum Teil diffusibel sein; bei der Aufarbeitung der Embryonen könnte es teils ausgewaschen worden sein, sich aber teils auch bei der Fixierung an der Blastomerenoberfläche niedergeschlagen haben. Letzteres könnte auch für Leptin aus nur partiell lysierten Hüllenresten gelten. Bei der Herstellung der Realschnittpräparate werden die Hüllen hingegen nicht lysiert, sie verbleiben hier im Präparat. Es wäre zu unterstellen, dass dabei zumindest rezeptorgebundenes Leptin in situ fixiert wird. Diffusibles Leptin aus dem PVS hingegen könnte gleichfalls wie bei der Herstellung der Ganzpräparate ausgewaschen worden sein oder sich der Blastomerenmembran anlagern. Überdies lässt sich in den Semidünnschnitten neben der Membranbetonung aber auch eine deutlich zytoplasmatische Leptinsignalkomponente ausmachen, die dem typischen halbmondförmigen Signal der Ganzpräparate entspricht. Auch dieses Signal zeigt aber bei der IHC an Semidünnschnitten keine ausgeprägte Polarität im Sinne eines leptinreichen versus -armen Pols. Eine mögliche Schlussfolgerung und Hypothese, die sich aus den vorgenannten Aspekten ergibt ist die, dass von der Tubenschleimhaut sezerniertes oder transsudiertes Leptin per diffusionem den Weg über die embryonalen Hüllen sowie den perivitellinen Spalt nimmt. Aufgrund des geringen Vernetzungsgrads der Matrix des perivitellinen Spalts (Denker 2000) kann das Leptin im Rahmen des Einbettungsprotokolls hier ausgewaschen werden, während es in den Hüllproteinen der Mukoproteidschicht, die selbst nicht diffusibel sind, ortsgebunden verbleiben kann, sofern es zu diesen eine hohe Affinität hat und dort angereichert wird. Ferner bindet es sich möglicherweise auf der apikalen Blastomerenmembran, wo es ja immunhistochemisch stark nachweisbar ist. Bei dieser Bindung ist neben der rezeptorvermittelten Bindung auch eine unspezifische (z.B. elektrostatische) Bindung denkbar. Oberflächengebundene Leptinrezeptoren sind in Blastozysten mittels RT-nested-PCR nachgewiesen worden (Cervero et al. 2005). Die Autoren postulieren auch eine membranständige Lokalisation des Rezeptors an der apikalen Trophoblastoberfläche, d.h. dem histologischen Ort, an dem wir Leptin in den präsumptiven Trophoblastzellen nachgewiesen haben. Die Frage, ob es sich nun hier um rezeptorgebundenes Leptin handelt, kann anhand der erhobenen Daten aber nicht sicher beantwortet werden. Zu dieser Vorstellung, dass das von uns nachgewiesene Leptin mütterlichen Ursprungs ist, passt auch die Aussage vieler Autoren bezüglich des Beginns der embryoeigenen Proteintranslation. Diese beginnt für die Mehrzahl der Proteine erst ab dem 8- bis 16-Zell-Stadium (Pacheco-Trigon et al. 2002) und speziell für das Leptin sogar erst im Blastozystenstadium (Kawamura et al. 2003; Kawamura et al. 2002). Diese Interpretation widerspricht den Schlussfolgerungen von Antczak und Van Blerkom nicht. Einerseits wäre eine endozytotische Aufnahme des Leptins in das Zytoplasma der

Blastomeren denkbar, andererseits muss das zytoplasmatische Leptin nicht zwangsläufig desselben Ursprungs sein wie das membranständige. In Anbetracht der von Antczak und Van Blerkom publizierten Befunde, die Leptin intrazytoplasmatisch bereits ab dem Oozytenstadium kontinuierlich nachweisen, und den zwei Komponenten des hier gefundenen Leptinsignals (intrazytoplasmatisch vs. oberflächengebunden) scheint wahrscheinlich, dass auch zwei Quellen des Leptins anzunehmen sind: zum einen aus dem umgebenden Milieu aufgenommen, zum anderen von Beginn an intrazytoplasmatisch lokalisiert (oozytären Ursprungs oder postzygotisch synthetisiert).

4.8 Literaturdaten zu Asymmetrien als Vorstufen der Achsenbildung in frühesten Entwicklungsstadien beim Säugetier

4.8.1 Asymmetrisches Färbeverhalten nach Quecksilber-Bromphenolblau-Färbung

Der Versuch, Gradienten, wie sie z.B. von der Segregationshypothese unterstellt werden, experimentell nachzuweisen, ist schon häufig unternommen worden. Im Rahmen mehrere Publikationen haben Dalcq und Mulnard (Dalcq, 1951, 1954, 1955, 1962a, b, c, 1966; Mulnard 1955, 1965; Mulnard und Dalcq 1955) mit verschiedenen histochemischen Färbungen Unterschiede im Färbeverhalten von Embryonalknoten und Trophoblast bei Blastozysten von Säugetierembryonen (zumeist bei der Ratte) gesehen. Bei ungefurchten Oozyten beschrieben die Autoren eine sich anfärbende Ebene, die in bestimmtem Winkel zur A-V-Achse orientiert war. Die von den Autoren als „Dorsalseite“ beschriebene Zytoplasmaregion war besonders reich an RNA und zeichnete sich durch eine bestimmte Saure-Phosphatase-Reaktion aus (Mulnard 1955, 1965). In Furchungsstadien waren diese Befunde dann auf die Zellen des (präsumptiven) Embryonalknotens konzentriert.

Nach einer bestimmten Fixierung, der Formol-Alkohol-Eisessig-Fixierung (6 Teile Ethanol 60%, 3 Teile Formol 40%, 1 Teil Eisessig, d.h. wasserfreie Essigsäure), zeigen sich bei einigen Spezies bei Anwendung von unspezifischen Proteinfärbungen, wie z.B. der Quecksilber-Bromphenolblau-Färbung (HgBPB), ein ungleiches Färbeverhalten der Blastomeren: Die äußeren Blastomeren färben sich dabei dunkler an als die inneren. Innerhalb der äußeren Blastomeren wiederum sind die nach innen gewandten Zytoplasmaareale intensiver gefärbt als die apikalen. Bei frühen Blastozysten färben sich die Trophoblastzellen dann intensiver an als die des Embryonalknotens. Eine besonders intensive Anfärbung findet man dabei im Bereich des abembryonalen Trophoblasten. Das beschriebene Färbemuster ist also mit der Emb-Ab-Achse gleichsinnig orientiert. Die Resultate konnten am Kaninchenembryo (Denker 1970) wie am Katzenembryo (Denker et al. 1978) erhoben werden, nicht eindeutig dagegen bei Maus und Hamster (Denker 1972). Abbildung 34 (a) zeigt einen HgBPB gefärbten Paraffinschnitt einer 63h Kaninchenmorula,

(b), eine Schemazeichnung der entsprechenden Befunde von der Katze. Dieses charakteristische Färbeverhalten bei der HgBPB-Färbung zeigte sich jedoch nur nach FAE-Fixierung, nicht nach Bouin, Gefriersubstitution oder anderen Fixierungen. Da die FAE-Fixierung eine Reihe von Substanzen aus dem Gewebe extrahiert (vgl. Dick et al. 1968, zitiert bei Denker 1972) wäre denkbar, dass der beobachtete Effekt auf einen besonderen Reichtum der weniger stark anfärbten präsumptiven Embryonalknotenzellen an einer FAE-löslichen Proteinfraction zurückzuführen ist. Da die Färbeasymmetrien auch an proteinextrahierten Präparaten aufgetreten sind (nicht publiziertes Material), muss es sich um die Anfärbung von mit dem angewandten Protokoll nicht extrahierbaren Proteinen handeln. Dafür kämen beispielsweise Zytoskelettelemente in Frage. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte dies aber zumindest für Aktin und Zytokeratine nicht verifiziert werden.

4.8.2 Befunde zu molekularen Ungleichverteilungen bei präimplantativen Embryonen

Im folgenden Kapitel soll der Versuch unternommen werden, eine Zusammenschau von Befunden zur Expression verschiedener mit der Zelldifferenzierung assoziierter Moleküle in präimplantativen Embryonen zu geben. Das Problematische daran wird sein, dass viele dieser Nachweise nicht mit topografischen Verfahren (Histochemie), sondern biochemisch/molekularbiologisch, ggf. getrennt nach ICM und Trophoblast erhoben wurden, und sie auch nicht auf die Frage der Achsenbildung, sondern die der Allokation fokussieren. Besonders am Mausmodell wurden dabei einige Marker identifiziert, die für die Entwicklung bzw. Determination der einzelnen Zelllinien offenbar von Bedeutung sind. Es zeichnet sich bei der „Aufspaltung“ einer Zellpopulation in zwei Folgezelllinien dabei immer wieder ein Schema ab, bei dem zwei konkurrierende Moleküle/Marker durch das letztliche Überwiegen eines Markers über die Zugehörigkeit der Blastomere zu einer Zelllinie entscheiden (Rossant 2004).

Oct-4 gilt als Marker für die ICM und wird allgemein auch als „Totipotenzmarker“ (Kirchhof et al. 2000; Ovitt und Schöler 1998) angesehen. Es wurde in 33% der Blastomeren bei humanen 7-10-Zellern (Hansis et al. 2001) nachgewiesen, und kommt dabei in ICM-Zellen in bis zu 31fach höherer Konzentration als in TE-Zellen vor (Hansis et al. 2000). Ferner differenzieren sich Maus-ICM-Zellen in TE, wenn die Oct-4-Expression ausgeschaltet wird (Palmieri et al. 1994). Während in frühen Morulae noch alle Blastomeren Oct-4 exprimieren, ist dies bei späten Morulae und Blastozysten nur noch in den inneren Zellen bzw. später nur noch dem Epiblasten (EPI) der Fall, während in den äußeren Blastomeren (TE-Vorläufer) Cdx-2, im primitiven Endoderm (PE) GATA-6 überwiegt (Niwa et al. 2005; Smith 2005). In die Determination innerer Blastomeren in PE und EPI ist auch Nanog

involviert, und determiniert hier die Allokation der Blastomeren zu EPI. Weitere Trophoblast-Marker sind Eomes (Hancock et al. 1999) und Mash-2 (Rossant et al. 1998) und Cdx-2 (Beck et al. 1995; Strumpf et al. 2005). Angaben zu Verteilungsmustern in frühen Entwicklungsstadien sind aber noch sehr spärlich, z.T. widersprüchlich und für eine Diskussion der Achsenbildungsprozesse noch nicht detailliert genug.

Der Frage nachgehend, wie Nährstoffe aus dem Uterusmilieu in die Blastozyste gelangen könnten, fand Assémat et al. (2005) mittels Western-Blot, dass der Multiligandenrezeptor Cubilin ab dem Achtzellstadium in Rattenembryonen exprimiert wird. Während sich in frühen Morulae das Zytoplasma aller Blastomeren diffus anfärbt, zeigte sich ab dem Blastozystenstadium zunehmend eine Lokalisation in den apikalen Membrandomänen des Trophoektoderms. Auch konnten die Autoren zeigen, dass die Endozytose von Apolipoproteinen und HDL mit der Cubilin-Expression kolokalisiert ist. Die Autoren unterstellen daher eine Bedeutung des Cubilins im Rahmen der Ernährung und Implantation des Embryos. Besonders von Anhängern der Polarisationshypothese werden in diesem Zusammenhang auch Zell-Zell-Kontakte avisiert. Während E-Cadherin/Catenin-Komplexe ubiquitär im Embryo vorhanden sind, findet man tight-junctions nur im Trophoblasten (Fleming et al. 1991; Fleming et al. 2004). Tight junctions werden an den apikolateralen Membrandomänen der äußeren Blastomeren ausgebildet. Die hierfür notwendige Proteinexpression beginnt frühestens ab dem Achtzellstadium (Fleming et al. 2004).

Besondere Aufmerksamkeit muss im Zusammenhang mit frühembryonalen Polaritäten und asymmetrischer Zellteilung den Mikrotubuli-assoziierten Proteinen der PAR-Familie zukommen, da sie bei vielen Organismen (z.B. *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster*) bekannterweise von Bedeutung sind. Hier steuern sie asymmetrische Zellteilung und Determinantenverteilung auf die Tochterblastomeren. Auch in frühen Mausembryonen wurden für die Mikrotubuli-assoziierten Proteine PAR-1, CLASP2 und dynactin-p50 die Verteilungsmuster beschrieben (Moore und Zernicka-Goetz 2005). Sie wurden ebenso wie PARD6b und EMK1 (Vinot et al. 2005) während der ersten Furchungsteilungen in räumlicher Nähe zur Meiose- und ersten Mitosespindel lokalisiert. Während der Kompaktion wird die bis dahin homogene Verteilung dann ungleich: PARD6b ist mehr am apikalen Zellpol, EMK1 mehr entlang der baso-lateralen Zytoplasmadomäne lokalisiert. Die Autoren fordern daher, dass die genannten Proteine bei der Blastozystenbildung eine wichtige Rolle spielen müssen. Hinweise auf eine achsgebende Asymmetrie ergeben sich hieraus aber nicht; Ungleichverteilungen, die spätere Achsen vorwegnehmen würden, sind nicht beobachtet worden.

Mutmaßliche Trophoektoderm-Marker bei der Maus sind beta-HCG und beta-LH (Talmadge et al. 1983), welches in seiner Aminosäuresequenz zu 82% dem beta-HCG entspricht (Shome und Parlow 1973). Hansis (Hansis et al. 2004) konnte mittels RT-PCR zeigen, dass beta-HCG und Oct-4 nicht gemeinsam in menschlichen 2-5-Zeller-Blastomeren exprimiert werden. Die Autoren fordern daher, dass die (zukünftige) Allokation der Blastomeren an der Expression eines dieser Marker abgelesen werden kann.

Jüngst veröffentlichte die Arbeitsgruppe um Zernicka-Goetz (Torres-Padilla et al. 2007) Befunde, nach denen die Arginin-Methylierung des Histons H3 in präimplantativen Mausembryonen bei der Zellallokation eine Rolle spielt. Demnach ist der Arginin-Methylierungsgrad des Histons H3 in den ¼-Blastomeren, die zur ICM beisteuern, höher als in präsumptiven Trophoblastzellen. Die Folge dieses höheren Methylierungsgrads ist eine Aktivierung der Genexpression von Nanog und Sox2.

4.9 Blastomerendetermination

Die Frage, wie die Allokation vor sich geht, welche Zelle also schließlich welchen Differenzierungszustand erreichen wird, muss erweitert werden durch die Frage, wann und wodurch eine Zelle beginnt, diese Differenzierungsrichtung einzuschlagen, wann also ihre Determination stattfindet. Unter allen Spezies gibt es solche, deren Embryonen in der Frühentwicklung eine starke Regulationsfähigkeit zeigen und solche, mit wenig Regulationspotential. Beide Typen, gehen letztlich auf ein unterschiedliches Mischungsverhältnis zweier Mechanismen zurück:

- a. Mosaiktyp: Segregation zytoplasmatischer Determinanten, hier wenig Regulationsfähigkeit
- b. Zell-Zell-Interaktion, Induktion von Zelle zu Zelle, hierbei erhebliche Regulationsfähigkeit etwa bei Zellverlust oder –transplantation.

Die Säugetiere gehörten nach konventioneller Vorstellung bis vor ca. 15 Jahren zu den Spezies mit der höchsten Regulationsfähigkeit. Eine maßgebliche Rolle der Segregation beim Säuger ist daher meist verworfen worden (Review bei Gurdon 1992). Seidel (1952) zeigte mit seinem „Ausschaltungsversuch“ bereits, dass bei Zerstörung einer der zwei ½ Blastomeren beim Kaninchenembryo sich aus der verbliebenen entweder nur Embryoblast oder Trophoblast aber auch eine vollständige Blastozyste entwickeln kann. Er folgerte, dass zytoplasmatische Determinanten für die beiden Zellreihen in der Zygote vorliegen und je nach Lage der ersten Furchung diese Determinanten in der verbliebenen ½ Blastomere überwiegen, fehlen oder eben in ursprünglichen Verhältnis erhalten

bleiben. Obwohl Seidel dies nicht in seiner Diskussion der Befunde betonte, impliziert das Experiment doch auch die Anlage der Emb-Ab-Achse schon in der Zygote. In den folgenden Jahrzehnten wurden die größtenteils deutschsprachigen Veröffentlichungen Seidels bei der Diskussion ähnlicher Befunde allerdings oft außer Acht gelassen.

Um weitere Hinweise auf den Determinationszeitpunkt bei Säugetieren zu erhalten, sind in und seit den 70er und 80er Jahren zahlreiche Experimente durchgeführt worden, die grob nach zwei methodischen Ansätzen unterschieden werden müssen: Zum einen handelt es sich um eine deskriptive Herangehensweise. Hierbei werden Morphologie oder histochemische Eigenschaften des Embryos als Momentaufnahme aus der Entwicklung betrachtet (statisch). Ebenfalls zu den deskriptiven Verfahrensweisen zählen Cell-Lineage- oder Tracingstudien. Letzteren liegt der Gedanke zugrunde, das Zytoplasma eines frühen Furchungsstadiums anzufärben oder anderweitig identifizierbar zu machen, so dass man seinen Verbleib in einem späteren Embryonalstadium bestimmt. Zum anderen müssen davon experimentelle Herangehensweisen im engeren Sinne unterschieden werden, bei denen der Embryo (über eine Injektion hinaus), also z.B. durch Blastomerenisolation/Re-Aggregation/Transplantation oder auch durch Gentransfer manipuliert wird.

Es konnte schon in den 70er Jahren mit verschiedenartigen Versuchsansätzen gezeigt werden, dass bei der Maus bei frühen Blastozysten noch keine endgültige Determination von ICM und Trophoblast stattgefunden hat. Was Cell-Lineage-Untersuchungen anbelangt, so legten zunächst Tracing-Experimente den Schluss nahe, dass Zellen von Furchungsstadien, Morulae und frühen Blastozysten noch durch eine hohe Plastizität (also das Fehlen einer starren Determination) charakterisiert sind. Markiert man einzelne äußere Blastomeren von 2-, 8-, 16- und 32-Zellern der Maus durch Injektion von Meerrettichperoxidase in das Zytoplasma, so zeigte sich, dass nach entsprechender Kulturdauer in allen Fällen auch markierte Zellen in der ICM nachweisbar waren, die beimpften äußeren Blastomeren auch des 32-Zellers also auch noch zytoplasmatische Substanz zur ICM beisteuern können (Balakier und Pedersen 1982). Umgekehrt zeigte Richard Gardner (Gardner 1982; Gardner und Papaioannou 1975) nach GPI-Injektion in innere Zellen, dass auch bei 3,5 Tage alten Mäuse-Blastozysten noch Blastomeren der inneren Zellmasse Abkömmlinge zum Trophoblast beisteuern können. In den 80er Jahren folgten Versuche, die mittels Injektion von Fluorochromen in 1/16-Blastomeren zu einem vergleichbaren Ergebnis kamen (Fleming 1987). Auch hier zeigte sich, dass 1/16-Blastomeren sowohl der ICM wie auch des Trophoblasten noch Tochterblastomeren zur jeweils anderen Zelllinie beisteuern können.

Auch Isolations/Re-Aggregationsversuche lieferten Hinweise für frühembryonale Plastizität: Atienza-Samols und Sherman (1979) isolierten aus fünf Tage alten Mausblastozysten die ICM und kultivierten die Zellen. Nach bis zu zehn Tagen in Kultur identifizierten die Autoren auch trophoblastoide Zellen. Ein ähnliches Experiment von Julia Chisholm (Chisholm 1984; Chisholm et al. 1985) gipfelte in der Erkenntnis, dass nicht alle Blastomeren zum gleichen Zeitpunkt determiniert werden und eine intraembryonale Variabilität besteht, ja dass auch innerhalb der inneren Zellmasse eines Embryos determinierte und nicht determinierte Blastomeren vorliegen. Handyside (1978) isolierte die inneren Zellen von späten Morulae sowie frühen und späten Blastozysten und fand nach in-vitro Kultivierung derselben Blastozysten-ähnliche Gebilde (im Falle der Morulae und der frühen Blastozysten). Weitere Autoren haben diese Ergebnisse bestätigt (Hogan und Tilly 1978). Johnson und Ziomek (1983) isolierten 1/16-Blastomeren, rearrangierten getrennt aus deren polaren und apolaren Zellen (nachdem zunächst alle Blastomeren bei Furchungsstadien als apolar gelten, entwickeln die außen liegenden präsumptiven Trophoblastzellen dann eine polare Organisation) „neue Morulae“ und inkubierten diese. Später waren sowohl in den aus polaren wie apolaren Blastomeren entstandene Embryonen ICM sowie Trophoblast nachweisbar.

Chimärenbildungsversuche zeigen, dass eine erstaunliche Flexibilität noch im Blastozystenstadium zu finden ist. Beispielsweise hat Papaioannou (1982) Zellen der inneren Zellmasse und des Trophoblasten verschiedener Embryonen isoliert und durch Markierung einer der beiden Zellpopulationen durch Meerrettichperoxidase unterscheidbar gemacht. Anschließend rearrangierte die Autorin „neue“ Blastozysten, die aus der ICM des einen und dem Trophoblasten des anderen Ausgangsembryos bestanden. Die Lage der ICM innerhalb der neuen Blastozyste wurde frei gewählt, die neue ICM also nicht etwa an der gleichen Stelle positioniert, an der sich die ursprüngliche befunden hatte. Nach Kultivierung und Transfer in Muttertiere kam es anschließend aber zu einem normalen Schwangerschaftsverlauf.

Experimente dieser Art wurden in den folgenden Jahren mit diversen Modifikationen und an verschiedenen Spezies wiederholt (auch Mottla et al. 1995; Nichols und Gardner 1984; Pedersen und Balakier 1981; Pedersen et al. 1982; Pedersen et al. 1986; Sato und Muramatsu 1987; Spindle 1978; Wiley 1978; Winkel und Pedersen 1988; Ziomek et al. 1982), das Ergebnis dokumentierte aber stets die erstaunliche Plastizität präimplantativer Embryonen. Ciermerych et al. (2000) setzten aus separierten $\frac{1}{2}$ Blastomeren neue Zweizeller so zusammen, dass sie entweder aus zwei animalen oder vegetativen Zellen

bestanden. Dieser Versuch endete ebenfalls mit Entstehung ganzer Organismen und legt auch die Annahme einer Bedeutungslosigkeit der A-V-Achse nahe. Auch aktuelle Arbeiten (Kunath et al. 2004) ziehen aus den genannten Befunden den Schluss, dass eine irreversible Determination von ICM und Trophoblast erst im Blastozystenstadium eintritt.

Die in Experimenten dieser Art oft dokumentierte Plastizität frühembryonaler Blastomeren wurde bedauerlicherweise in aktuellen Diskussionsbeiträgen (s. etwa Kapitel 4.15 zur Diskussion um die Präimplantationsdiagnostik) zur Frage des Determinationszeitpunktes allzu oft außer Acht gelassen. Gleichwohl erscheinen diese Befunde wichtig für die Diskussion um ethische Aspekte der Regulationsbefähigung der Zellen (Totipotenz, Stammzellgewinnung). Grund der Ablehnung der Annahme einer Achsenprädestination beim Säuger war weniger das Vorliegen falsifizierender Experimente, als vielmehr der Fehlen verifizierender Argumente. Die Frage nach einem über die einzelne Blastomere hinausgehenden, gleichwohl aus der Summe der Teilgradienten der einzelnen Blastomeren konstituierten, den ganzen Embryo umfassenden Gradienten bzw. einer Achse, ist nicht direkt untersucht worden, doch hielt man eine Koexistenz von Plastizität und Faktorens segregation für abwegig. Beispielsweise wurde versucht, das Zytoplasma von Mauszygoten mit einer Ultraschallsonde zu verwirbeln (Evsikov et al. 1994). Nach dem Transfer dieser Embryonen in scheinchwangere Mäuse kam es dennoch zur Geburt lebender und fertiler Nachkommen. Die Autoren folgern, dass ooplasmatische Segregation bei der Maus keine Rolle spielen kann.

Vor allem auf Grund der zahlreichen Isolations- und Reaggregationsexperimente (s.o.), hielt sich die Annahme, dass eine Segregation ooplasmatischer Faktoren beim Säuger entweder nicht stattfindet oder aber für die Entwicklung des Individuums entbehrlich ist. Auch jüngere Publikationen der Zernicka-Goetz-Gruppe (Zernicka-Goetz 1998) kommen zu diesem Ergebnis, da dadurch dass größere zytoplasmatische Areale der Zygote vom animalen bzw. vegetativen Pol entfernt worden waren, ohne dass das Entwicklungspotential des Embryos nachhaltig beeinflusst wurde. Es stellt sich aber im Licht der aktuellen Befunde allgemeiner die Frage, ob Plastizität der Furchungsstadien und die Segregation von (evtl. Achseninformation tragenden) Determinanten sich widersprechen. In diesem Kontext auch zu diskutieren sind die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde: Die bei Antczak- und Van Blerkom (1997 und 1999) und hier gezeigte Ungleichverteilung des Leptins weist die Segregation ungleich verteilter Faktoren von einer Blastomere zu deren Tochterblastomeren direkt nach. Eine Polarität des Embryos, die dem Nachweis eines determinierenden Faktors im Sinne der Segregationshypothese entsprochen hätte konnte aber nicht gezeigte werden. Hingegen

konnte gezeigt werden, dass Leptin im präsumptiven Trophoblasten intrazytoplasmatisch polar verteilt ist und besonders im Bereich der Zytoplasmamembran vorkommt, die dem perivitellinen Spalt zugewandt ist. Die hier vorgelegte Arbeit liefert also Belege für eine radiärsymmetrische Außen-Innen-Segregation, nicht aber für eine Bilateralsymmetrie oder eine Anlage der Emb-Ab-Achse.

4.10 Polarisationshypothese

Johnson und Ziomek (1981) machten bei der Maus die Beobachtung, dass sich Blastomeren etwa ab dem 8-Zellstadium in folgender Weise verändern: Einerseits wird aus einem relativ losen Zellhaufen eine geschlossene Masse ohne wesentliche Interzellularräume. Hierzu werden an den Interzellularmembranen Zelljunctionen ausgebildet. Diesen Vorgang bezeichnet man als Kompaktierung („compaction“). Zugleich entwickeln die äußeren Blastomeren eine polare Struktur, besonders offensichtlich darin, dass die apikale Seite Mikrovilli ausbildet (Abb. 35). Bei der Teilung isolierter Blastomeren fiel auf, dass sie sich asymmetrisch in eine größere fernerhin polare Zelle und eine kleinere apolare Zelle teilen, wobei im Embryo letztere innen zu liegen kommt (Abb. 36). Ausgehend von dieser Beobachtung entwickelten Johnson und Ziomek die Polarisationshypothese, die diese asymmetrische Zellteilung als Mechanismus für die Allokation (s. Einleitung) annimmt. Im Grunde handelt es sich dabei um eine modifizierte Innen-Außen-Hypothese, da sie nicht negiert, dass die Innen- oder Außenlage über das Schicksal einer Blastomere entscheidet. Allerdings wird der zelluläre Mechanismus der Bildung innerer und äußerer Blastomeren präzisiert. Fleming et al. (1984) wies ab dem 8-Zell-Stadium in den apikolateralen Membrandomänen der äußeren Blastomeren das Tight-junction-Polypeptid ZO-1 nach und konnte damit molekulare Hinweise zur Bestätigung der Polarisationshypothese liefern. Zusätzliche Untermauerung erfuhr die These durch den Nachweis der Expression von E-Cadherin, ebenfalls Bestandteil epitheltypischer Zell-Zell-Kontakte (Adhaerens-Junctionen), in den äußeren Blastomeren, den präsumptiven Trophoblastzellen (Johnson et al. 1986). Tight-junctions und E-Cadherin sind Charakteristika epitheloider Zellen. Ihre Ausbildung markiert die Differenzierung des ersten Epithels in der Ontogenese (dem Trophoblasten).

Auch zur Fähigkeit einzelner Zellen, sich in bestimmten Stadien noch in die jeweils andere „Schiene“ einzureihen, haben Johnson und Ziomek Versuche gemacht (1983). Sie fanden dabei, dass isolierte polare oder apolare 1/16-Blastomeren nach zwei weiteren Teilungen in Kultur jeweils sowohl polare wie auch apolare Blastomeren hervorbringen. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Befunde an histologischen Realschnitten, die eine Leptinungleichverteilung mit maximalem Signal in den apikalen Zytoplasmadomänen der

äußeren Blastomeren zeigen, sind mit der Polarisationshypothese gut in Einklang zu bringen. Auch sie zeigen den Unterschied von apolaren inneren und polaren äußeren Blastomeren, wobei innerhalb der äußeren Zellen eine apikobasale Asymmetrie besteht. Die Polarisationshypothese liefert eine Deskription der Entstehung von Embryoblast und Trophoblast auf zellulärer Ebene. Zur Lage des sich entwickelnden Embryonalknotens, also der Entstehung der Embryonal-Abembryonal-Achse hingegen gibt sie keine Ansatzpunkte.

4.11 Frühembryonale Achsenbildungsprozesse

In jüngerer Vergangenheit rückte neben der Frage nach der Determination von Embryo- und Trophoblast zunehmend auch die Frage nach der Entstehung der frühembryonalen Achsen und ihrer Lagebeziehung zu den Achsen des späteren Organismus ins Zentrum des wissenschaftlichen Interesses. Im embryologischen Sinn wird eine Achse definiert als Linie, die zwei deutlich voneinander verschiedene Endpunkte miteinander verbindet. Von grundlegender Bedeutung ist in der Embryologie die Entstehung der Hauptachsen des Organismus (Kranio-Kaudal-Achse und Dorso-Ventral-Achse) (vgl. Abb. 38). Diese beiden Achsen definieren die einzig mögliche Spiegelebene des menschlichen Körpers. Sie entspricht der Medianebene. Die asymmetrische Lage der inneren Organe wird dabei vernachlässigt. Damit aber ein lebensfähiges Individuum entstehen kann und nicht eine chaotische Mischung aus Geweben, wie etwa in einem Teratom, muss in der frühen Embryonalentwicklung vor allem eine orthotope Anordnung der Organanlagen entlang dieser Achsen zustande kommen (Denker 2004).

4.11.1 Embryonal-Abembryonal-Achse

Die Art der Bildung der Dorso-Ventral-Achse in der Embryologie ist unumstritten: Sie entspricht der Embryonal-Abembryonal-Achse der Blastozyste, wobei die der Blastozystenöhle zugewandte Seite der inneren Zellmasse im adulten Organismus ventral, die zur Rauberschen Deckschicht hin gelegene dorsal zu liegen kommt (vgl. Abb. 38). Wirft man die Frage nach dem Grund für eine bestimmte Orientierung der Embryonal-Abembryonal-Achse auf, so liegt eine mechanistische Antwort nahe. Der Embryonalknoten bildet sich gegenüber der Stelle, an der die Bildung der Blastozystenöhle beginnt beziehungsweise der Stelle, wo diese ihre größte Ausdehnung erreicht. Diese Antwort bleibt jedoch unzulänglich, da sie ja nicht klärt, ob die Position des Embryonalknotens damit willkürlich ist, oder ob ein anderer Mechanismus die Entstehung der Blastozystenöhle an einer definierten Position bewirkt. Für den Mechanismus ihrer Entstehung bietet eine der in der Einleitung dargelegten Hypothesen, nämlich die Segregationshypothese, einen Erklärungsansatz. Hierbei wäre denkbar, dass die

Embryonal-Abembryonal-Achse entlang eines Gradienten oder auch orthogonal dazu entsteht. Der embryonale Pol der Blastozyste könnte sich beispielsweise dort bilden, wo sich in der Zygote eine an einem morphogenetisch wirksamen Faktor reiche Domäne befand (vgl. Abb. 1, 2). Die Innen-Außen-Hypothese dagegen geht davon aus, dass die Embryonal-Abembryonal-Achse eben nicht in einer definierten Position entsteht, sondern vielmehr an einer nicht vorbestimmten Stelle zufällig zu liegen kommt. In der Folge induziert der Embryonalknoten dann, so die Hypothese, auch Veränderungen in dem sie bedeckenden polaren Trophoblasten (eine Hypothese zur Kommunikation beider Zelllinien stellen beispielsweise Rossant et al. (2004) auf).

Die von Johnson entwickelte Polarisationshypothese wird durch die hier vorgelegten Ergebnisse zur intrazytoplasmatischen Leptinverteilung unterstützt (s. vorhergehendes Kapitel). Ebenso wie die Innen-Außen- und die Polarisationshypothese bietet sie aber keinen Anhalt für eine Vorbestimmtheit der Position der ICM innerhalb des Trophoblasten bzw. damit der Orientierung der Embryonal-Abembryonal-Achse.

4.11.2 Animal-vegetative-Achse

Die Animal-vegetative-Achse tritt bereits bei der Eizellreifung in Erscheinung. Sie wird durch die Lage des bei der ersten meiotischen Teilung entstehenden ersten Polkörperchens, welches den animalen Pol markiert, definiert. Gegenüber liegt dann vereinbarungsgemäß der vegetative Pol. Da den Polkörperchen beim Säugetier aber keine entwicklungsbiologische Bedeutung für die Entwicklung des Embryos zugemessen wurde, schien auch die A-V-Achse nur von terminologischer Relevanz zu sein. Die Polkörper sind (von bestimmten Mäusestämmen abgesehen) beim Säugetier nach der Expansion der Blastozystenöhle nicht mehr sicher nachweisbar, da sie im Laufe der präimplantativen Entwicklung degenerieren. Die Annahme einer die Position der Polkörperchenabschnürung definierenden, zytoplasmatisch festgelegten A-V-Achse im Sinne einer polaren Zytoplasmaarchitektur, wie sie bei Nichtsäugern belegt war, wurde zudem auch wegen der enormen Plastizität des Säugetierembryos (s.o.) für unwahrscheinlich erachtet. Gleichfalls galt die Etablierung einer bleibenden Achseninformation eben durch das Polkörperchen, etwa durch Sekretion morphogener Substanzen, als unwahrscheinlich. In Zusammenschau dieser Befunde wurde die A-V-Achse als temporär und entwicklungsbiologisch irrelevant betrachtet. Auch ist bis in jüngste Zeit angenommen worden, dass beim Säugetier beide Polkörperchen örtlich schlecht fixiert seien und während der Furchungsteilungen leicht verlagert werden, so dass sie keinen verlässlichen Marker für den animalen Pol in späteren Stadien darstellen könnten. Der Versuch, die Frage nach Persistenz der Lage der A-V-Achse zu

beantworten, scheitert im Stadium der Zygote schon am Fehlen weiterer Fixpunkte. Erst durch manipulatorisches Anbringen solcher Fixpunkte, wie etwa Öltröpfcheninjektion in die Zona pellucida (s. Gardner 2001b; Gardner und Davies 2006; Details s.u.), und vor allem durch den unerwarteten Befund, dass es bei der Maus eine auffällige Regelmäßigkeit in der Ausrichtung der Furchungsteilungen (und zumindest bei einigen Mäusestämmen auch der Emb-Ab-Achse) in Relation zur A-V-Achse gibt (vgl. Kapitel 4.11.3) wurde eine Diskussion um die Bedeutung der A-V-Achse eingeleitet.

4.11.3 Kranio-Kaudal-Achse/Anterior-Posterior-Achse

Die Dorso-Ventral-Achse ist, wie im vorangegangenen Kapitel hergeleitet, an der Embryonal-Abembryonal-Achse orientiert. Wann aber entsteht im Verlaufe der Entwicklung eine dauerhafte zweite Achse, die die Orientierung der späteren Kranio-Kaudal-Achse definiert? Der Zeitpunkt der Bildung (d.h. des Sichtbarwerdens) der Achse ist die Gastrulation (s. Abb. 39). Es wurde bisher angenommen, dass dies auch der Zeitpunkt ihrer Determination ist, die Lage der Achse also nicht vorbestimmt ist. Die Ingression des Epiblasten mit der Bildung des Mesoderms geht von der Primitivgrube aus. Diese liegt aber nicht im Zentrum der Keimscheibe, sondern im schmaleren Teil der in der Aufsicht birnenförmigen Keimscheibe. Die Primitivgrube beziehungsweise ihr vorderer Randwall, der so genannte Hensen'sche Knoten, verlagert sich während der weiteren Entwicklung in Richtung des schmaleren Pols der zunächst birnenförmigen Keimscheibe, während die bei der Gastrulation am Hensen'schen Knoten einwandernden Zellen unter dem Epiblasten vorwiegend zum breiteren Pol der Keimscheibe hinwandern. Dieser entspricht dem kranialen Ende des späteren Organismus. Ist aber ein zufallsmäßig asymmetrischer Beginn der Ingression die genuine Etablierung der Kranio-Kaudal-Achse, oder orientiert sich die Ausrichtung an einer vorbestehenden Achse?

4.11.4 Persistenz der A-V-Achse

In jüngerer Vergangenheit sind eine Reihe von Befunden publiziert worden, die darauf hinweisen, dass die traditionelle Sichtweise, dass die A-V-Achse beim Säuger nur temporären Charakter besitzt, revidiert werden muss, ja dass sie vielleicht sogar funktionelle Bedeutung hat. Eine der ersten Beobachtungen, die hier von Interesse waren, ist die, dass Blastozysten nicht etwa kugelförmig (wie zuvor meist angenommen) sind sondern vielmehr ellipsoid (Gardner 1997). Genaue Beobachtungen desselben Autors haben ergeben, dass wenigstens das zweite Polkörperchen bei bestimmten Mäusestämmen erheblich länger nachweisbar bleibt als das bisher angenommen wurde. So identifizierte Gardner bei in vitro wie bei in vivo entwickelten Blastozysten (Closed-bred PO Mäuse) etwa 2/3 der Polkörper in intaktem Zustand. Nach der Expansion der

Blastozystenhöhle war es allerdings erforderlich, die Zona pellucida zu entfernen, da das Polkörperchen zwischen der Blastozyste und der Zona abgeplattet wurde, so dass es ohne diese Vorbehandlung schlecht erkennbar war. Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen konnte Gardner zunächst zeigen, dass das zweite Polkörperchen durch eine Zytoplasmabrücke (Gardner spricht von einer „tether“) mit der Zygote verbunden ist und auch während der weiteren Teilungen mit einer der Tochterzellen verbunden bleibt. Eine solche Zytoplasmabrücke (deren evtl. funktionelle Bedeutung unklar ist) würde es erlauben, den animalen Pol solange zu identifizieren, wie das Polkörperchen sichtbar ist. Gardner impliziert weiterhin auch, dass das Polkörperchen und „Tether“ unterliegende Zytoplasma, das ja den animalen Pol im engeren Sinne darstellt, in der unmittelbar benachbarten Blastomere räumlich persistiert.

Besonders auffällig ist nun, dass die Furchungsteilungen in Relation zu dem so identifizierten animalen Pol nicht zufällig sondern in gesetzmäßiger Orientierung ablaufen: Vergleicht man die Zygote mit einem Erdball, an dessen Nordpol das Polkörperchen liegt, so verläuft die erste Furchungsteilung stets meridional, d.h. vom Nord- zum Südpol (Abb. 28; 37). Das Polkörperchen kommt dann im Spaltraum zwischen den beiden $\frac{1}{2}$ Blastomeren zu liegen. Diese Beobachtung war zwar schon vor Gardners neueren Publikationen gemacht worden, ihr wurde aber wenig Bedeutung beigemessen, da man das Polkörperchen für beweglich hielt, und es räumlich einleuchtend erscheint, dass in der Ebene der Furchungsteilung (also im Winkel zwischen den $\frac{1}{2}$ -Blastomeren) am meisten Platz ist. Nach traditioneller Sichtweise gab es ja auch keine funktionell bedeutende dauerhafte Achse. Im Morulastadium (ohne sichtbares Polkörperchen) wäre dann auch die temporäre A-V-Achse vergangen und der Embryo äußerlich damit wieder kugelsymmetrisch, wie die Oozyte vor den Reifungsteilungen.

Gardner (1997) beobachtete auch die weitere Entwicklung der Mausembryonen bis zum Blastozystenstadium. Die Tatsache, dass nach der Entfernung der Zona pellucida das Polkörperchen weiterhin sichtbar blieb, ermöglichte die Beobachtung, dass es sich im Blastozystenstadium im Übergangsbereich von embryonalem und abembryonalem Trophoblasten findet (bei 188 Mausembryonen projizierte sich das Polkörperchen in 152 Fällen exakt auf den Übergangsbereich, in 22 Fällen hatte es einen maximalen Abstand von einem halben Durchmesser des Embryos und nur in 14 Fällen war es weiter entfernt). Zu der Beobachtung Gardners, das Polkörperchen sei am animalen Pol fixiert, würde die Aussage Antczaks und Van Blerkoms (1997) zu Leptingehalt und Lage des Polkörperchens nicht exakt passen. Diese lokalisierten ja das zweite Polkörperchen in der leptinreichen Domäne der Zygote und später diese Domäne im abembryonalen

Trophoblasten. Der animale Pol und das Polkörperchen würden sich nach Gardner aber auf den Übergangsbereich von embryonalem und abembryonalem Trophoblasten projizieren (Abb. 28, 32). Konträrer Auffassung zur Theorie des fixierten Polkörperchens ist die Arbeitsgruppe um Solter, da sie in Zeitrafferaufnahmen die Orientierung der ersten Furchungsteilung nicht in der Ebene des zweiten Polkörperchens sehen, anschließend aber eine Wanderungsbewegung des Polkörperchens in die Ebene der Furchungsteilung hinein beobachtet haben (Hiiragi und Solter 2004; Hiiragi und Solter 2005). Diese Kontroverse ist nicht beigelegt. Offen bleibt die Frage, in wieweit hier Unterschiede in der Wahl der Mäusestämme oder in der angewandten Methodik eine Rolle spielen (Gardner 2006b).

Die Bedeutung des Polkörperchens wurde auch im Rahmen von In-Vitro-Fertilisationsprojekten untersucht. Bei Studien zur Mikroinjektionen von Spermien (ICSI) in Oozyten etwa zeigte sich, dass Polkörperchen in der Mehrzahl der Fälle nicht im Bereich der Zellmembran in der Nähe der Meiosespindel lokalisiert sind. Ferner konnte demonstriert werden, dass eine Spermieninjektion in der Nähe der Meiosespindel (und nicht im Bereich des Polkörperchens) zu einer besseren Entwicklung der Embryonen (gemessen am Blastomerenzahl, Fragmentationsgrad und „embryo score“) führt (Cooke et al. 2003). Die Autoren postulieren, den animalen Pol nicht durch die Lage des Polkörperchens sondern durch die Spindel zu definieren. Über den diesen unterschiedlichen Ergebnissen der Embryonalentwicklung zu Grunde liegenden Mechanismus, d.h. wieso es nicht völlig gleich ist, wo ein Spermium injiziert wird, sind bisher keine gezielten Untersuchungen gemacht worden. Für die vorliegende Diskussion sind diese Befunde aber insofern interessant, als es aus der Arbeitsgruppe um Solter (Hiiragi und Solter 2005) jüngst ebenfalls Hinweise gibt, dass die Position der beiden Pronuclei für die Lage der ersten FT und der folgenden Achsenbildungsprozesse von Bedeutung ist (s.u.).

4.11.5 Lagebeziehung A-V – Emb-Ab-Achse

Nachdem Gardner bei bestimmten Mäusestämmen beobachtet hatte (s.o.), dass das Polkörperchen auch bis ins Blastozystenstadium hinein nachweisbar sein kann, stellte sich die Frage, wie es in Bezug auf die dann ja offenkundige Embryonal-Abembryonal-Achse (und damit die spätere Dorso-ventral-Achse) liegt. Als zusätzlichen Fixpunkt am präimplantativen Embryo injizierte der Autor drei Öltröpfchen in die dem Polkörperchen unmittelbar aufliegende Zona pellucida (Gardner 2001a). Nach Immobilisierung der Embryonen durch Alginateinbettung bis zum Morula- und Blastozystenstadium konnte die Lagebeziehung der markierten Region der Zona pellucida sowohl zur

Polkörperchenposition als auch zur dann sichtbaren Embryonal-Abembryonal-Achse bestimmt werden. Bei 87 eingebetteten Embryonen und 57 auswertbaren Blastozysten lagen 52 Markierungen innerhalb eines 30°-Winkels zur Orthogonalen auf der Embryonal-Abembryonal-Achse. Die Embryonal-Abembryonal-Achse steht also in diesen Fällen senkrecht ($\pm 30^\circ$) auf der A-V-Achse, eine bemerkenswerte Korrelation.

Die experimentelle Beobachtung der A-V-Achse ist problematisch. Gardner beobachtete (1997), dass die Blastozyste in der Aufsicht (vom Embryonalpol aus) nicht kreisrund sondern oval ist (Gardner definiert einen kleinen und einen großen Durchmesser: lower diameter/greater diameter, s. Abb. 40). Es liegt dabei das Polkörperchen in der Achse des größeren Durchmessers. Für die experimentelle Beobachtung der A-V-Achse erwies sich aber auch diese Ovalität als unzureichend, da die ungleichen Durchmesser nicht in allen Stadien erkennbar sind und Polkörperchen nur bei bestimmten Spezies und in späteren Stadien nur nach Entfernung der Zona pellucida erkennbar sind. Es haben sich daher mehrere Arbeitsgruppen mit Markierungsversuchen beschäftigt: der experimentelle Ansatz, die im Zygotenstadium gegebenen morphologischen Achsen als Ausdruck einer zygotalen Bilateralsymmetrie durch Öltröpfcheninjektion von außen fassbar zu machen, ohne die Blastomeren selbst zu manipulieren hat, wie schon kurz erwähnt, in der Folge auch die Arbeitsgruppe um Solter beschäftigt, die allerdings zu anderen Ergebnissen und Schlussfolgerungen kam. Mittels Zeitrafferaufnahmen in eingebetteter Zygoten (Hiiragi und Solter 2004) konnten sie nicht nachvollziehen, dass die erste Furchung meridional verläuft bzw. dass diese mit der AV-Achse zusammenfällt. Bei weitergehenden Untersuchungen (Motosugi et al. 2005) bis zum Blastozystenstadium fanden sie wiederum mittels Zeitrafferaufnahmen, dass auch das Zytoplasma der zwei $\frac{1}{2}$ -Blastomeren in keiner konstanten Weise auf die Achsen der Blastozyste projizierbar ist, und fordern daher, dass es keine Achsenprädestination beim Säuger gibt. Die Entstehung der Embryonal-Abembryonal-Achse sehen die Autoren durch mechanische Einflüsse der Zona pellucida auf den Embryo initiiert. Sie gründen diese These auf mikroskopische Beobachtungen bei ihren Versuchen: Wie Gardner sehen sie nicht eine kugel- sondern eine ellipsoidförmige Zona pellucida. Nach Entfernung der Zona pellucida, so die Beobachtungen, runde sich der Embryo aber stets in eine kugelige Form ab, weshalb sie eine Induktion der Achse durch dieses mechanische Moment vermuten.

Gardner (Gardner 2006b) hält das von den Autoren gelieferte Datenmaterial für unzureichend und untermauert seine Position (Gardner 2006a), indem er die Zona aufweichte und Doppelmarkierungsexperimente durchführte, bei denen das Öltröpfchen in der ZP nur bis zum frühen Blastozystenstadium als Marker diente und dann durch

intrazytoplasmatische Markierung der unmittelbar unterliegenden Blastomere mit Carbocyanidin-Zytoplasmamarkern abgelöst wurde. Die Markierungen projizierten sich aber im fortgeschrittenen Blastozystenstadium signifikant häufiger auf die Äquatorregion als andere zufällig markierte Blastomeren. Dies war selbst nach Entfernung der ZP im 2-Zellstadium und Markierung der dem Pb unterliegenden Blastomere im frühen Blastozystenstadium noch der Fall. Die Ergebnisse untermauern also die Feststellung, dass die Bilateralsymmetrie der Blastozyste zu der des Zytoplasmas der Zygote in festem Verhältnis steht, und dass zumindest die Emb-Ab-Achse intrinsisch prädestiniert ist. Aufbauend auf dieser interessanten Beobachtung ergibt sich natürlich die Frage nach einem Kausalzusammenhang zwischen der Position des Polkörperchens (und damit der A-V-Achse) und der Lage der Embryonal-Abembryonal-Achse.

Untersuchungen zur prospektiven Bedeutung mittels Blastomeren-Markierung ('Tracing'):
Zur Klärung der Frage nach der Lagebeziehung von Embryonal-Abembryonal- und A-V-Achse, bieten sich neben den genannten extrazellulär angebrachten Achsen-Markern auch Blastomeren-Markierungs-Versuche an, wie sie bereits zur Untersuchung des Determinationszeitpunktes beschrieben wurden. Interessant ist bei Experimenten nicht nur zu welcher Zelllinie (Tropho- bzw. Embryoblast) die markierten Tochterzellen gehören sondern auch der Verbleib der Markersubstanz aus der animalen bzw. vegetativen Hemisphäre des Mehrzellers in Projektion auf die Blastozyste. Hierzu erfolgte die Injektion einer Markersubstanz in z.B. eine der beiden $\frac{1}{2}$ -Blastomeren. Wenn der Marker stabil ist und intrazellulär verbleibt, ist davon auszugehen, dass alle markierten Zellen einer Morula oder Blastozyste auf jene $\frac{1}{2}$ -Blastomere zurückgehen, die markiert worden war. Alarcón (Alarcón und Marikawa 2003) konnte auf diese Weise aber eine räumliche Assoziation von A-V-Achse und Embryonal-Abembryonal-Achse bei Mausembryonen mit der Injektion von Dil (s.u.) nicht zeigen.

Insbesondere die Arbeitsgruppe um Zernicka-Goetz beschäftigte sich in der Folge intensiv mit diesem gedanklichen Ansatz. Mittels Injektion verschiedener Farbstoffe (Dil, DiD oder DiO, jeweils Akronyme für die vielfach genutzten Indo- und Oxacarbocyanide) in $\frac{1}{2}$ -Blastomeren zeigten sie, dass (im Durchschnitt der Versuchsserie) 84,7% der Blastomeren der embryonalen Hemisphäre der Blastozyste ebenso wie 80,2% der abembryonalen Blastomeren jeweils von einer der beiden $\frac{1}{2}$ -Blastomeren abstammt. Zugleich stellten sie fest, dass die Ebene der ersten Furchungsteilung sich regelmäßig in einer bestimmten Orientierung auf die Blastozyste projizieren lässt (Piotrowska et al. 2001), vgl. auch Abbildung 37. Die Ebene der ersten Furchungsteilung entspricht dabei in

späteren Stadien einer Grenzlinie markierter und nicht markierter Zellen, der sog. „clonal border“. Diese liegt in der Blastozyste senkrecht auf der Embryonal-Abembryonal-Achse. Zwischen der „boundary zone“ (der Grenzzone in ICM und Trophoblast zwischen embryonaler und abembryonaler Hemisphäre) und der clonal border stellten die Autoren aber eine geringe Winkelabweichung („tilt“) (Piotrowska und Zernicka-Goetz 2001) fest. Diese Erkenntnisse zu Grunde legend schließen sie, dass eine feste Beziehung zwischen Ebene der ersten Furchungsteilung und Embryonal-Abembryonal-Achse besteht und weiterhin, dass der Winkel zwischen beiden aber nicht exakt 90° beträgt sondern leicht dagegen verkippt ist. Weiterhin ergab sich aus dem experimentellen Ansatz auch die Möglichkeit, die Zahl der Tochterblastomeren jeder ½-Blastomere zu quantifizieren, da sie ja aufgrund der Markierung in der Blastozyste identifizierbar waren. Es stellte sich heraus, dass jene ½-Blastomere, die sich zuerst erneut (dann in zwei ¼ Blastomeren) teilt, mehr Blastomeren zur Blastozyste beisteuert (ihren zeitlichen Vorsprung also gewissermaßen beibehält), und, dass diese auch quantitativ mehrheitlich zum späteren Embryonalknoten beitragen.

Piotrowska-Nitsche und Zernicka-Goetz (2005) zeigten ebenfalls mittels Tracingstudien, dass die durch die ersten zwei Furchen gebildeten vier ¼-Blastomeren sich bereits voneinander unterscheiden (‘spatial allocation’). Sie können sowohl durch die Abfolge ihrer Entstehung wie auch durch die prospektive Lage ihrer zytoplasmatischen Substanz in der Blastozyste identifiziert werden. Die erste Furche verläuft meist meridional (das Polkörperchen zeigt per definitionem zum animalen Pol, vergleichbar dem „Nordpol“, die zweite dann äquatorial oder schräg zur ersten (aber auch die umgekehrte Abfolge kommt, wenn auch seltener, vor). So lassen sich die ¼-Blastomeren in ihrer Genealogie und Position beschreiben. Weiterhin wird gezeigt, dass die dem vegetativen Pol entstammenden Blastomeren überwiegend zum muralen Trophoblasten beisteuern, was die Ergebnisse des ½-Blastomeren-Tracings bestätigt. Reaggregationsversuche (derselben Studie) zeigten, dass Chimären aus Blastomeren, die durch eine äquatoriale oder schräge Furche entstanden waren, signifikant seltener implantationsfähige Embryonen hervorbrachten als solche aus meridional gefurchten Blastomeren. Zusammenfassend zeigen diese Untersuchungen, dass die Orientierung der ersten Furche und die Lage der Emb-Ab-Achse miteinander verknüpft zu sein scheinen.

4.12 Der Spermieeintrittspunkt

Die Arbeitsgruppe um Zernicka-Goetz hat sich neben den genannten Tracingexperimenten auch der Bedeutung des Spermienpenetrationspunktes (SEP) gewidmet (Piotrowska und Zernicka-Goetz 2001; Piotrowska und Zernicka-Goetz 2002).

Der SEP ist, etwa bei Amphibien ist dies gut belegt (vgl. Denker 2004), mehr als der bloße und zufällige Ort des Spermieintritts. In der Folge des Spermieintritts kommt es durch eine Umstrukturierung des Zytoskeletts und von Morphogengradienten zu einer Reorganisation des kortikalen Zytoplasmas, und diese wiederum ist wesentlich für die Anlage der späteren Hauptkörperachsen. Beim Säuger lagen aber wiederum kaum Befunde über eine Bedeutung des SEP vor. Die Position des (nur kurzzeitig sichtbaren) Fertilisationskonus als sichtbarem Ausdruck des SEP wurde durch Markierung bis ins Blastozystenstadium verfolgbar gemacht. Es zeigte sich, dass nicht nur die Orientierung der ersten Furche in Lagebeziehung zum SEP steht, sondern auch, dass jene ½-Blastomere, die den SEP enthält, sich vor der anderen teilt, diesen zeitlichen „Vorsprung“ beibehält, und mehr Blastomeren zur embryonalen Hälfte der Blastozyste beisteuert. Bei parthenogenetischen Embryonen, die ja keinen SEP enthalten, war eine Festlegung der prospektiven Bedeutung der beiden ½-Blastomeren hingegen nicht nachweisbar (Piotrowska und Zernicka-Goetz 2002).

Gardner ist bezüglich der Bedeutung des SEP anderer Meinung, da seine Arbeitsgruppe auch in parthenogenetischen Embryonen eine kontinuierliche Bilateralsymmetrie von der Oozyte bis zur Blastozyste festgestellt hat (Gardner und Davies 2006).

Als zusammenfassendes Resultat präsentierte die Arbeitsgruppe Zernicka-Goetz eine neue, gleichwohl auf den bestehenden fußende, Hypothese zur Entstehung der Zelllinien und Achsen des frühen Säugetierembryos: die „Cleavage-Driven-Hypothese“ (Zernicka-Goetz 2002) (Abb. 37). Danach entspricht die Orientierung der ersten Furche der der A-V-Achse. Die Blastomere, die den SEP erhält (rot gezeichnet) teilt sich zuerst erneut und stellt überwiegend die zytoplasmatische Substanz der späteren embryonalen Blastozystenhemisphäre. Die clonal border ist gegenüber der A-V-Achse bzw. der Ebene der ersten FT leicht verkippt (Piotrowska und Zernicka-Goetz 2001). Die Arbeitsgruppe ergänzte ihre These jüngst (Plusa et al. 2005) durch Ergebnisse von Untersuchungen, mit denen der Frage nachgegangen wird, welche der zusammenfallenden Achsen (A-V-Achse, Ebene der ersten Furche) für die Lage der clonal border von führender Bedeutung ist. Hierzu wurde die Zygote in eine ovaläre Form gezwungen, sodass die erste Furche nicht in der Ebene der A-V-Achse liegen konnte. Tatsächlich zeigt das anschließende Blastomerentracing aber, dass dennoch eine der beiden Blastomeren überwiegend die embryonale Hemisphäre stellt. Hier zeigen Übereinstimmungen mit Anschauung der Arbeitsgruppe um Solter, die ja annimmt, dass die A-V-Achse dem Embryo durch die ovaläre Form der Zona pellucida aufgezwungen wird.

Im Ergebnis heißt das, dass die Orientierung der ersten Furche, auch wenn sie willkürlich und durch Manipulation aufgezwungen wurde, doch die Emb-Ab-Achse prädestiniert. Die A-V-Achse, von der Gardner etwa ja eine feste Lagebeziehung zur Emb-Ab-Achse einfordert, hätte demnach per se keinen prädiktiven Wert für die Orientierung der definitiven Körperachsen, jedenfalls der Dorso-Ventral-Achse. Bei unbeeinflusster Entwicklung besteht eine Tendenz dazu, dass die erste Furche gleich orientiert ist wie die A-V-Achse (vgl. Kapitel 4.11.4). Durch manipulatorische Deformierung des Embryos ist diese Tendenz aber offenbar beeinflussbar. Die Lage der definitiven Körperachsen ergäbe sich demnach aus der Orientierung der ersten Furche und der nicht exakt senkrecht darauf stehenden Emb-Ab-Achse. Der letztgenannte Beitrag bestätigt neuerlich die schon zitierte Flexibilität der präimplantativen Säugerembryonen und das gerade von Zernicka-Goetz in Reviewartikeln (z.B. Zernicka-Goetz 2004; Zernicka-Goetz 2006) immer wieder hervorgehobene Nebeneinander von gewissen Vorgaben für die sich herausbildenden Muster und einer hohen Regulationsfähigkeit, d.h. der Fähigkeit zur Antwort auf äußere Einflüsse. Das Konzept des gleichzeitigen Vorliegens von Strukturvorgaben in Oozyte und Zygote sowie der Bedeutung der Information, die sich aus der Lage der Zellen zueinander ergibt, wurde von anderen Autoren schon früher postuliert (Denker 1976, 1983).

4.13 Synopsis der gegenwärtigen Positionen verschiedener Autoren zu Trophoblast-/Embryoblastdetermination und Achsenbildung beim Säugetier

Weitgehende Übereinstimmung besteht darin, dass, mehr als dies bis vor etwa 10 Jahren angenommen wurde, im präimplantativen Säugerembryo eine Koexistenz von Prädetermination der Körperachsen und gleichzeitiger Plastizität vorliegt. Während molekulare Asymmetrien als Grundlage dieser Achsenprädestination in der Diskussion sind, gilt das Vorliegen starr, mosaikartig angeordneter Morphogenterritorien oder -gradienten auf Grund der vielfach dokumentierten Flexibilität der Embryonen als unwahrscheinlich.

Johnson, MH	<p>Polarisationshypothese: Ab dem 8-Zell-Stadium entstehen aus polaren Zellen zwei Subpopulationen (Embryoblast=ICM; Trophoblast=TB) durch asymmetrische Zellteilung. Interzellularkontakte spielen bei der Zellallokation eine Rolle.</p> <p>Für durch Segregation gesteuerte Allokation oder eine Prädetermination der Emb-Ab-Achse gibt es aber keine Hinweise; diese entsteht durch zufällige Lage der ICM innerhalb der Blastozystenöhle (Innen-Außen-Hypothese!), Zytokingesteuerte Zell-Zell-Interaktionen (ICM – muraler TB)</p>
-------------	--

	<p>leiten dann die unterschiedl. Differenzierung ein. <i>PCR, ISH, IHC, Western-Blot</i></p>
Rossant, J	<p>Zugrundeliegende Determinationsmechanismen werden im Sinn der Innen-Außen- oder Polarisationshypothese diskutiert: Oct-4 und Nanog sind ICM-Determinanten Cdx2 und Eomes sind für die TB-Entwicklung nötig <i>PCR, ISH, IHC, Western-Blot</i></p>
Gardner, RL	<p>Die 1. FT orientiert sich an der A-V-Achse (unabhängig von Form der ZP), beide lassen sich auf die Blastozyste projizieren und stehen dann senkrecht auf der Emb-Ab-Achse, der SEP spielt hierbei keine Rolle. Das 2. Polkörperchen bleibt durch zytoplasmatische 'tether' an eine Blastomere fixiert und markiert den animalen Pol bis ins Blastozystenstadium. Die ovaläre Form der Oozyte/Zygote (GD/LD) steht in Bezug zu den embryonalen Achsen. <i>Zeitraffer, Tracing, Öltröpfchen</i></p>
Solter, D und Hiragi, T	<p>Die 1. Furche verläuft senkrecht zur Ebene der Pronuclei, das 2. Pb wandert in Ebene der FT, es besteht keine Lagebeziehung der A-V- und Emb-Ab-Achse; kugelförmige Zygote wird durch ellipsenmantelf. ZP in ovaläre Form gezwungen, die ihrerseits achsenrelevant ist. <i>Zeitraffer</i></p>
Zernicka-Goetz, M	<p>Die 1. Furche orientiert sich im Normalfall an der A-V-Achse, bei mech. Verformung aber an der Zygotenform; beide lassen sich auf die Blastozyste projizieren und stehen dann leicht verkippt senkrecht auf der Emb-Ab-Achse, die ½-Blastomere mit dem SEP steuert überwiegend den Embryonalpol bei. <i>Tracing, Zeitraffer</i></p>

Kursiv gedruckt sind jeweils die von den Arbeitsgruppen überwiegend angewandten experimentellen Techniken.

4.14 Bedeutung der hier demonstrierten Ergebnisse für Blastomerenpotenz und Stammzellpotenz

Eng verwoben mit der bereits angeschnittenen Determinationsfrage ist die Frage nach der Bildungspotenz der Blastomeren. Zu unterscheiden ist zwischen Totipotenz, also der Fähigkeit zur Bildung eines vollständigen Organismus, und Pluripotenz, der Fähigkeit zur Bildung vieler verschiedener Gewebe, nicht aber eines Individuums. Während die Zygote totipotent ist, geht den Blastomeren im Laufe der präimplantativen Entwicklung die Totipotenz verloren. Von Interesse ist im Zusammenhang mit der Stammzelldiskussion,

ob man einen Zeitpunkt, zu dem bestimmte Zellen ihre Totipotenz verlieren, angeben kann. Der Umgang mit embryonalen Stammzellen (die ja meist aus der inneren Zellmasse von Blastozysten, oder neuerdings auch immer häufiger aus Furchungsstadien, gewonnen werden) ist ethisch nicht unproblematisch, weil sie unter „Verbrauch“ menschlicher Embryonen entstehen. Zudem wäre aber das Hantieren mit totipotenten Zellen per se problematisch, da aus Ihnen ja jeweils neue Individuen hervorgehen könnten. Entsprechende Fragen ergeben sich auch im Zusammenhang mit der Präimplantationsdiagnostik (s. Kapitel 4.15).

Konkret ergibt sich die Frage: Ab welchem Stadium gibt es Hinweise über die Gleich- oder Ungleichheit der Blastomeren, und sind solche Ungleichheiten graduell oder absolut? Nach der Innen-Außen-Hypothese wäre z.B. leicht begreiflich, dass die Blastomeren, nachdem ihre prospektive Bedeutung als zu einer der beiden Zellpopulationen (ICM/TB) zugehörig definiert und ihre prospektive Potenz eingeschränkt ist, nicht mehr totipotent wären. Die isolierten inneren Zellen und die daraus gewonnenen embryonalen Stammzellen wären dann wahrscheinlich auch nicht mehr totipotent. Folgt man gedanklich der Segregationshypothese, so wäre dagegen vorstellbar, dass ein kontinuierlich über den Embryo verteilter Gradient, der die Potenzen bestimmt, sich auch in jeder einzelnen Blastomere wiederfindet (s. Abb. 1). Damit entspräche jede Blastomere einem Embryo im Miniaturformat mit allen darin eventuell enthaltenen Achseninformationen. Dass eine solche Blastomere totipotent sein könnte, scheint erheblich plausibler als im vorgenannten Fall.

Dem entgegen haben einige Autoren die Befunde von Antczak und Van Blerkom aber auch anders gewertet. Beier (Beier 1998) argumentiert, dass die mit den Furchungsteilungen zunehmende Verkleinerung des Gradienten innerhalb einer Blastomere ihre Bildungspotenzen schmälert, so dass vom 8-Zellstadium an nicht mehr von einer Totipotenz ausgegangen werden kann. Die Belege, die die existierende Literatur für eine so frühe Potenzeinschränkung liefert, sind allerdings sehr mager; vor allem gibt es kein Experiment, in dem sicher nachgewiesen wäre, dass alle Blastomeren des 8-Zell-Stadiums die Totipotenz verloren hätten. Der von Beier angeführte „Beleg“ anhand der Arbeit von Gebert et al. (1995) beruht hinsichtlich der Aussagekraft der eingesetzten Methodik auf einer Fehlinterpretation (s. Denker 2002 S. 32f.).

Die Frage der Stammzellpotenz ist ihrerseits mit zahlreichen experimentellen Ansätzen untersucht worden, die darzustellen den hier möglichen Rahmen überschreitet. Einen ausführlichen Übersichtsartikel zu frühembryonaler Musterbildung und der

Stammzellpotenzfrage unter Einbeziehung der aktuellen experimentellen Daten gibt Denker (2004). An dieser Stelle muss die Diskussion auf den für die vorliegende Arbeit wesentlichen Aspekt, die evtl. Aussagekraft von Verteilungsgradienten wie den des untersuchten Leptins beschränkt werden. Die hier demonstrierten Resultate haben aber die reale Existenz des zunächst von Antczak und Van Blerkom (1997) beschriebenen, Gradienten aber als sehr fraglich und wahrscheinlich durch Artefakte vorgetäuscht eingestuft (s. Kapitel 4.2 und 4.5). Dem Versuch der Herleitung einer Aussage zur Potenzfrage aus einem leptinarmen und –reichen Pol bei präimplantativen Embryonen muss daher eine Absage erteilt werden. Aus den denselben Befunden ergeben sich allerdings, wenn sie im Licht der Polarisationshypothese gesehen werden, interessante Ansatzpunkte: Schon in frühen Morulae, vor der Kompaktierung, konnte eine Leptinungleichverteilung zu Gunsten des subapikalen Zytoplasmas der äußeren Blastomeren nachgewiesen werden. Das spricht für das Bestehen einer gewissen prädeterminierenden Zytoplasmaarchitektur mindestens ab den frühesten Furchungsstadien, da Oozyten und Zygoten in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurden. Aus einer Ungleichheit der Blastomeren, die auf derartige Weise rein deskriptiv festgestellt wird, ist allerdings ohne entwicklungsbiologisches Experiment noch kein Rückschluss auf den Potenzstatus möglich.

4.15 Bedeutung der hier demonstrierten Ergebnisse für In-vitro-Fertilisation und Präimplantationsdiagnostik

Im Rahmen der In-Vitro-Fertilisation werden in vielen Ländern (in Deutschland aktuell durch das EschG §1/1 3+5 verboten) mehr Oozyten befruchtet, als Embryonen transferiert werden, um eine Selektion vornehmen zu können, welche die Erfolgsrate erhöhen soll. In Staaten, die eine Präimplantationsdiagnostik untersagen, wird derzeit dabei nach rein morphologischen Kriterien selektioniert. Überzählige Embryonen werden in Ländern, in denen dies zulässig ist, kryokonserviert. Zu den berücksichtigten Kriterien gehören etwa die Blastomerenzahl oder der Fragmentationsgrad (Ebner et al. 2003). Neuere Publikationen zeigen darüber hinaus, dass das Bestehen eines sog. „Halo-Effekts“ positiv mit der Schwangerschaftsrate korreliert (Stalf et al. 2002). Unter dem Halo-Effekt versteht man eine durchlichtmikroskopisch sichtbare halbmondförmige Zytoplasmaverdichtung in den befruchteten Oozyten. Einen umfassenden Review über Ansätze zur Optimierung der Schwangerschaftsrate nach IVF gibt Scott (2003).

Die Frage nach der Gleich- oder Verschiedenartigkeit der einzelnen Blastomeren ist bei der Durchführung einer PID von Interesse. Beispielsweise soll die Blastomerenbiopsie dem verbleibenden „Restembryo“ keinen Schaden zufügen. Gäbe es eine

unterschiedliche Ausstattung der Blastomeren mit morphogenetisch relevanten Komponenten, angezeigt z.B. durch unterschiedliche Leptinkonzentrationen, so wäre leicht vorstellbar, dass das Entfernen etwa der leptinreichsten (oder –ärmsten) Blastomeren entwicklungsbehindernd wirkt. Die Erfolgsrate von IVF nach PID würde dadurch gemindert. Hinweise dieser Art sind bereits in den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts bekannt geworden: Zerstört man beim Kaninchen eine $\frac{1}{2}$ -Blastomere oder auch drei $\frac{1}{4}$ -Blastomeren, so kann in einigen Fällen aus der verbleibenden Blastomere ein ganzer Embryo entstehen, in anderen Fällen aber nicht. Hier tritt eine Ungleichheit der Blastomeren, die demnach nicht alle als totipotent einzustufen wären, zu Tage (Seidel 1952, 1960; Moore et al. 1968). Geber und Sampaio (1999) biopsierten menschliche Embryonen im 6-10-Zell-Stadium und kultivierten und beobachteten sowohl den Embryo wie auch die entnommene Blastomere: 50% der biopsierten Furchungsstadien erreichten das Blastozystenstadium. Auch die jeweilig entnommenen Blastomeren teilten sich (in 63% der Fälle) und bildeten eine Höhle aus (in 53% der Fälle).

Die Blastozystenbildungsrate der biopsierten Embryonen korrelierte positiv mit der Fähigkeit der zugehörigen Blastomere, sich zu teilen und ihrerseits eine Höhle auszubilden. Die Autoren schlugen daher vor, den Embryo zunächst zu konservieren und anhand der Entwicklung der biopsierten Blastomere die Verwendbarkeit/„Güte“ des Embryos vorauszusagen und bevorzugt Embryonen für einen Transfer in den Uterus zu verwenden, deren zugehörige Blastomere sich gut entwickelt hatte. So eindrucksvoll dieser Versuchsaufbau den Nutzen einer Blastomerenbiopsie demonstriert, so sehr zeigt er auch die Problematik der artefiziellen Zwillingsbildung, da sich auch aus den biopsierten Blastomeren kavitierende Embryonen bildeten. Die Biopsie einer totipotenten Blastomere kommt einer künstlichen Zwillingsbildung gleich. Das entspräche einem doppelten Verstoß gegen das Embryonenschutzgesetz (EschG §1/1 und §6/1). Die in dieser Arbeit vorgelegten Befunde zur Leptinverteilung in präimplantativen Kaninchenembryonen sind auch in diesem Kontext zu diskutieren, da sie einen Unterschied zwischen inneren und äußeren Blastomeren belegen. Es wäre also prinzipiell denkbar, dass die Entnahme einer inneren oder äußeren Blastomere den Embryo nicht gleichermaßen beeinträchtigt. Zwanglos hiermit in Einklang zu bringende Ergebnisse aus PID-Studien liegen aber gegenwärtig nicht vor. Auch bezüglich der Problematik der eventuellen Totipotenz der entnommenen Blastomere ist dieser Unterschied zu berücksichtigen (vgl. 4.14), d.h. er kann ein Hinweis sein, dass bei Biopsie einer bestimmten Blastomere möglicherweise eine totipotente Zelle gewonnen und für die Diagnostik „verbraucht“ wird. Ob man so weit gehen darf, einen solchen Schluss zu ziehen, kann allerdings solange noch nicht gesagt werden, wie keine experimentellen

Untersuchungen über die Korrelation von Leptingradient und Entwicklungspotenzen vorliegen.

4.16 Bedeutung der hier demonstrierten Ergebnisse für die Diskussion um Zeitpunkt und Mechanismus der Etablierung der Körperachsen und die Bedeutung von A-V- und Emb-Ab-Achse in diesem Zusammenhang

Hinweise auf Morphogengradienten, etwa durch Nachweis eines sie anzeigenden Leptingradienten wie er von Antczak und Van Blerkom (1997) beschrieben wurde, könnten für die Diskussion der frühembryonalen Achsen relevant sein. Dabei wäre es zweitrangig, ob Leptin selbst eine morphogenetische Bedeutung zukommt, oder ob seine Verteilung nur andere Ungleichverteilungen (nämlich der eigentlich morphogenetisch bedeutsamen Strukturen oder Substanzen) anzeigt. Ein Gradient stellt unabhängig von der ihn konstituierenden Substanz in jedem Fall eine Achse dar, deren Korrelation zu frühembryonalen Achsen dann allerdings noch zu beleuchten ist. Antczak und Van Blerkom (1997) hatten beschrieben, dass die leptinreiche Domäne zumeist das Polkörperchen einschließt. Somit könnte in grober Näherung der animale Pol als der leptinreiche definiert werden. Dieser Umstand verdient im Kontext der gegenwärtigen Diskussion um die A-V-Achse (s. Kap. 4.11.4) größte Aufmerksamkeit, da hiermit ja ihre Prädetermination schon im Oozytenstadium nahegelegt werden würde. Die experimentelle Überprüfung dieses Befundes ist außerhalb der hier vorgelegten Untersuchungen bis heute nicht erfolgt. Mit den hier vorgelegten Ergebnissen kann zur Lagebeziehung eines etwaigen Gradienten zum Polkörperchen (und damit zur A-V-Achse) allerdings direkt keine Aussage gemacht werden, da im Gegensatz zu Mensch und Maus das Polkörperchen beim Kaninchen nur sehr klein ist und in den immunhistochemischen Präparaten nicht eindeutig erkennbar ist, doch wurde durch den eindeutigen Befund der gleichmäßigen Leptinverteilung im histologischen Realschnitt (s. Kap. 4.5) deutlich, dass die im CLSM erscheinenden Ungleichverteilungen auf Artefakten beruhen, denn im zweiten hier beschriebenen Versuchsansatz, der Untersuchung der Leptinverteilung am histologischen Realschnitt, hat sich die über den Embryo polarisierte Leptinverteilung nicht verifizieren lassen. Eine Innen-Außen-Ungleichverteilung im Sinne der Polarisationshypothese hingegen konnte bestätigt werden. Wie in Kapitel 4.7 diskutiert, spricht dieser Befund nicht gegen eine Segregation an sich sondern nur gegen das Vorliegen einer frühembryonal vorgegebenen molekularen Achse.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung können wie folgt zusammengefasst werden:

1. Leptin konnte mit zwei unterschiedlichen methodischen Ansätzen in präimplantativen Kaninchenembryonen auf Zellebene lokalisiert werden.
2. In CLSM-Untersuchungen am Ganzpräparat zeichnet sich die Leptinverteilung im wesentlichen wie folgt ab:
 - a. In den äußeren Blastomeren höhere Leptinkonzentration als in den inneren.
 - b. Klares Maximum der Verteilung in der Region der (prospektiven) apikalen (dem PVS zugewandten) Membran.
 - c. Ein den Embryo im Ganzen umfassender Gradient mit einem leptinarmen und –reichen Pol stellt sich innerhalb der Population der äußeren Blastomeren dar.

Die hier vorgelegten Ergebnisse entsprechen in diesen Aspekten den von Antczak und Van Blerkom 1997 für Maus und Mensch erhobenen Befunden.

3. Bei der Leptindarstellung am histologischen Realschnitt zeigt sich zunächst:
 - a. In den äußeren Blastomeren eine höhere Leptinkonzentration als in den inneren (wie bei den Ganzpräparaten, vgl. 2.a).
 - b. Das zum perivitellinen Spalt gewandte Zytoplasma der äußeren Blastomeren und deren apikale Blastomerenmembran ist besonders leptinreich (entspricht 2.b).
 - c. Die embryonalen Hüllen, die Zona pellucida und die Mukoproteidschicht enthalten Leptin.
4. Bei der Detailanalyse und der dreidimensionalen Rekonstruktion der histologischen Realschnitte ergibt sich keine Polarität der präimplantativen Kaninchenmorula-/blastozyste im Sinne eines exzentrischen Gradienten, im Gegensatz zu den CLSM-Befunden an den Ganzpräparaten (2.c).
5. Bei den CLSM-Befunden sind verschiedene Artefakte zu berücksichtigen (Kapitel 4.2). Im Vergleich mit den Ergebnissen der Versuche an Realschnitten muss geschlossen werden, dass die hier und bei Antczak und Van Blerkom (1997) demonstrierten CLSM-Befunde, die einen leptinarmen und –reichen Pol zeigen, artefaktischen Ursprungs sind.
6. Zur Herkunft des nachgewiesenen Leptins: In Zusammenschau mit den von anderen Autoren vorgelegten Befunden scheint naheliegend, dass zwei Leptinquellen zu Grunde zu legen sind: Zum einen aus der Oozyte (Antczak und Van Blerkom 1997), zum anderen aus dem Tubensekret (Kawamura et al. 2002).

7. In der entwicklungsbiologischen Diskussion um die Entstehung frühembryonaler Achsen wird die Theorie eines Morphogen-Gradienten, wie Antczak und Van Blerkom ihn publiziert hatten für Säugetierembryonen, wegen der dokumentierten Plastizität der frühen Entwicklungsstadien von den meisten Autoren abgelehnt. Aufgrund von Befunden aus den letzten Jahren (Gardner, Zernicka-Goetz), die eine große Regelmäßigkeit der Geometrie der Furchungsteilungen und der Achsenbildung bei der Maus zeigen, muss eine Segregation zumindest achsen-relevanter Determinanten diskutiert werden.
8. Das im Ergebnis anzunehmende Leptinverteilungsmuster stützt die von Johnson 1981 vorgeschlagene Polarisationshypothese. Dies ist für die Frage der Zugehörigkeit einer Blastomerenbiopsie im Rahmen der PID relevant. Eine Prädetermination von Achsen (A-V, D-V) lässt sich anhand der Leptinverteilung beim Kaninchen aber nicht bestätigen (wenngleich auch nicht ausschließen).

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die von Antczak und Van Blerkom (1997 und 1999) vorgelegten Befunde über eine asymmetrische Leptinverteilung im präimplantativen Säugerembryo im Kaninchenmodell zu überprüfen und sie ggf. mit anderer Methodik kritisch zu hinterfragen. Antczak und Van Blerkom hatten publiziert, dass Leptin in Oozyten, Zygoten, Furchungsstadien, Morulae und Blastozysten polar verteilt ist. Nicht nur enthalten innere Blastomeren weniger Leptin als äußere, sondern vor allem soll es danach im Embryo einen leptinarmen- und reichen Pol geben. Die Fragestellung steht im Kontext einer in den vergangenen etwa 15 Jahren aufgekommenen Diskussion um die Entstehung frühembryonaler Achsen, die die hierzu bisher gängige Auffassung (dass die Emb-Ab-Achse, der Vorläufer der Dorso-Ventral-Achse, nicht prädeterminiert sei sondern aufgrund stochastischer Prozesse entstehe) in Frage stellt. Die A-V-Achse der Oozyte/Zygote hat nach dieser Vorstellung kein bleibendes Korrelat, die zweite definitive Körperachse, die Kranio-Kaudal-Achse, entsteht nach dieser Ansicht erst relativ spät, im Rahmen der Gastrulation. Durch neue experimentelle Befunde verschiedener Arbeitsgruppen ist dieses konventionelle Vorstellungskonstrukt in Frage gestellt worden. Die Untersuchung von immunhistochemischen Ganzpräparaten von Kaninchenmorulae und –blastozysten im CLSM konnte eine Ungleichverteilung des Leptins zu Gunsten der äußeren Blastomeren (der präsumptiven Trophoblastzellen) bestätigen. Das zusätzliche Vorliegen eines den Embryo erfassenden Gradienten im Sinne eines leptinreichen und –armen Pols schienen auch unsere CLSM-Daten zu suggerieren; Kontrollen mit alternativer Methodik zeigen jedoch, dass es sich hierbei offenbar um ein methodisch bedingtes Artefakt handelt: Histologische Realschnitte bestätigen zwar, dass Leptin überwiegend in den äußeren Blastomeren (mit Maximum am PVS-nahen Zellpol) lokalisiert ist, dass aber eine polare Ungleichverteilung über den ganzen Embryo nicht vorliegt. Zusätzlich zeigten die Experimente an den Realschnitten aber ein Vorkommen von Leptin in den extrazellulären embryonalen Hüllen. Die Entstehungsmöglichkeiten von Artefakten in histochemischen Untersuchungen am Ganzpräparat mit dem CLSM werden methodenkritisch diskutiert. Angaben über Ungleichverteilungen innerhalb dreidimensionaler Objekte aus CLSM-Untersuchungen müssen mit großer Zurückhaltung interpretiert werden. Der bislang suggestivste publizierte Befund bezüglich präimplantativ segregierter Morphogen-Gradienten beim Säugetier ist daher kritisch zu hinterfragen. Die vorgelegten Befunde stützen die von Johnson (1981) eingeführte Polarisationshypothese, die als Mechanismus der Allokation der Blastomeren zu ICM/TB die Entwicklung einer apikobasalen Polarität in Blastomeren und die Abspaltung apolarer innerer Zellen annimmt. Hinweise auf eine Prädetermination der Achsen des Embryos lassen sich anhand der Leptinverteilung nicht herleiten.

6. Literaturverzeichnis

1. Alarcón VB., Marikawa Y. (2003): Deviation of the blastocyst axis from the first cleavage plane does not affect the quality of mouse postimplantation development. *Biol Reprod* 69(4):1208-1212.
2. Albertini DF., Overstrom EW., Ebert KM. (1987): Changes in the organization of the actin cytoskeleton during preimplantation development of the pig embryo. *Biol Reprod* 37(2):441-451.
3. Alfer J., Muller-Schottle F., Classen-Linke I., von Rango U., Happel L., Beier-Hellwig K., Rath W., Beier HM. (2000): The endometrium as a novel target for leptin: differences in fertility and subfertility. *Mol Hum Reprod* 6(7):595-601.
4. Anderson JR., Wilcox MJ., Wade PR., Barrett SF. (2003): Segmentation and 3D reconstruction of biological cells from serial slice images. *Biomed Sci Instrum* 39:117-122.
5. Antczak M., Van Blerkom J. (1997): Oocyte influences on early development: the regulatory proteins leptin and STAT3 are polarized in mouse and human oocytes and differentially distributed within the cells of the preimplantation stage embryo. *Mol Hum Reprod* 3(12):1067-1086.
6. Antczak M., Van Blerkom J. (1999): Temporal and spatial aspects of fragmentation in early human embryos: possible effects on developmental competence and association with the differential elimination of regulatory proteins from polarized domains. *Hum Reprod* 14(2):429-447.
7. Assemat E., Vinot S., Gofflot F., Linsel-Nitschke P., Illien F., Chatelet F., Verroust P., Louvet-Vallee S., Rinninger F., Kozyraki R. (2005): Expression and role of cubilin in the internalization of nutrients during the peri-implantation development of the rodent embryo. *Biol Reprod* 72(5):1079-1086.
8. Atienza-Samols SB., Sherman MI. (1979): In vitro development of core cells of the inner cell mass of the mouse blastocyst: effects of conditioned medium. *J Exp Zool* 208(1):67-72.
9. Balakier H., Pedersen RA. (1982): Allocation of cells to inner cell mass and trophectoderm lineages in preimplantation mouse embryos. *Dev Biol* 90(2):352-362.
10. Beck F., Erler T., Russell A., James R. (1995): Expression of Cdx-2 in the mouse embryo and placenta: possible role in patterning of the extra-embryonic membranes. *Dev Dyn* 204(3):219-227.
11. Beier HM. (1998): Definition und Grenze der Totipotenz. *Ethik in der Medizin* 11:S23-S37.
12. Bornstein SR., Abu-Asab M., Glasow A., Path G., Hauner H., Tsokos M., Chrousos GP., Scherbaum WA. (2000): Immunohistochemical and ultrastructural localization of leptin and leptin receptor in human white adipose tissue and differentiating human adipose cells in primary culture. *Diabetes* 49(4):532-538.
13. Cervero A., Horcajadas JA., Dominguez F., Pellicer A., Simon C. (2005): Leptin system in embryo development and implantation: a protein in search of a function. *Reprod Biomed Online* 10(2):217-223.
14. Chisholm JC. (1984): Cell heterogeneity in the mouse inner cell mass. *J Embryol exp Morph* 82:60.
15. Chisholm JC., Houlston E. (1987): Cytokeratin filament assembly in the preimplantation mouse embryo. *Development* 101(3):565-582.
16. Chisholm JC., Johnson MH., Warren PD., Fleming TP., Pickering SJ. (1985): Developmental variability within and between mouse expanding blastocysts and their ICMs. *J Embryol Exp Morphol* 86(10):311-336.
17. Ciemerych MA., Mesnard D., Zernicka-Goetz M. (2000): Animal and vegetal poles of the mouse egg predict the polarity of the embryonic axis, yet are nonessential for development. *Development* 127(16):3467-3474.

18. Cooke S., Tyler JP., Driscoll GL. (2003): Meiotic spindle location and identification and its effect on embryonic cleavage plane and early development. *Hum Reprod* 18(11):2397-2405.
19. Coonen E., Dumoulin JCM., Ramaekers FCS. (1993): Intermediate filament protein expression in early development stages of the mouse. A confocal scanning laser microscopy study of in vitro fertilized and in vitro cultured pre-implantation mouse embryos. *Histochemistry* 99:141-149.
20. Craig J., Zhu H., Dyce PW., Petrik J., Li J. (2004): Leptin enhances oocyte nuclear and cytoplasmic maturation via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology* 145(11):5355-5363.
21. Crossett B., Suire S., Herrler A., Allen W. R., Stewart F. (1998): Transfer of a Uterine Lipocalin from the Endometrium of the Mare to the Developing Equine Conceptus. *Biology of Reproduction* 59:483-490.
22. Dalcq AM. (1951): New descriptive and experimental data concerning the mammalian egg, principally of the rat (With specification of a previous interpretation). *Proc kon ned Akd Wet Ser C* 54:469-479.
23. Dalcq AM. (1954): Nouvelles données structurales et cytochimiques sur l'oeuf des mammifères. *Rev gén Sci Pures Appl* 61:19-41.
24. Dalcq AM. (1955): Processes of synthesis during early development of rodent's eggs and embryos. In *Studies on Fertility* (ed. R.G. Harrison) 7:113-122.
25. Dalcq AM. (1957): [Terminology of induction.]. *Acta Anat (Basel)* 30(1-4):242-253.
26. Dalcq AM. (1962a): Evolution de l'organisation morphogénétique dans l'oocyte chez le Rat et la Souris. *Verh Anat Ges, Anat Anz Suppl* 109:373-382 .
27. Dalcq AM. (1962b): Localisations et evolution des phosphatases aux premiers stades du développement. *Bull Acad roy Med Belg VIIe Série* 2:573-610.
28. Dalcq AM. (1962c): Etudes cyto-enzymologiques sur les oeufs vivants de Souris incubés es présence d'ATP et d'autres mononucleotides. *Arch Biol* 73:405-444.
29. Dalcq AM. (1966): Détection des enzymes de déphosphorylation dans les oeufs de rat et de souris fixés au formol et traités in toto. *Arch Biol* 77:205-344.
30. Denker H.-W. (1970a): Topochemie hochmolekularer Kohlenhydratsubstanzen in Frühentwicklung und Implantation des Kaninchens. I. Allgemeine Lokalisierung und Charakterisierung hochmolekularer Kohlenhydratsubstanzen in frühen Embryonalstadien. *Zool. Jb. Physiol.* 75, 141-245
31. Denker H.W. (1970b): Topochemie hochmolekularer Kohlenhydratsubstanzen in Frühentwicklung und Implantation des Kaninchens. II. Beiträge zu entwicklungsphysiologischen Fragestellungen. *Zool. Jb. Physiol.* 75, 246-308
32. Denker H.-W. (1972): Furchung beim Säugetier: Differenzierung von Trophoblast und Embryonalknotenzellen. *Verh. Anat. Ges.* 66, *Anat. Anz Suppl.* 130, 267-272
33. Denker H.-W. (1976): Formation of the blastocyst: determination of trophoblast and embryonic knot. *Curr Top Pathol* 62(70):59-79.
34. Denker H.-W. (1983): Cell lineage, determination and differentiation in earliest developmental stages in mammals. *Bibl Anat* 24(11):22-58.
35. Denker H.-W. (2000): Structural dynamics and function of early embryonic coats. *Cells Tissues Organs* 166(2):180-207.
36. Denker H.-W. (2004): Early human development: new data raise important embryological and ethical questions relevant for stem cell research. *Naturwissenschaften* 91(1):1-21.
37. Denker H.-W. Eng LA., Mootz U., Hamner CE. (1978): Studies on the early development and implantation in the cat: 1. Cleavage and blastocyst formation. *Anat Anz* 144(5):457-468.

38. Denker H.-W. Gerdes HJ. (1979): The dynamic structure of rabbit blastocyst coverings. I. Transformation during regular preimplantation development. *Anat Embryol* 157(1):15-34.
39. Ebner T., Moser M, Sommergruber M, Tews G. (2003): Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: a review. *Hum Reprod Update* 9(3):251-262.
40. Eidsath A., Chernomordik V., Gandjbakhche A., Smith P., Russo A. (2002): Three-dimensional localization of fluorescent masses deeply embedded in tissue. *Phys Med Biol* 47(22):4079-4092.
41. El-Hefnawy T., Ioffe S., Dym M. (2000): Expression of the leptin receptor during germ cell development in the mouse testis. *Endocrinology* 141(7):2624-2630.
42. Emerson JA. (1988): Disruption of the cytokeratin filament network in the preimplantation mouse embryo. *Development* 104(2):219-234.
43. Evsikov SV., Morozova LM., Solomko AP. (1994): Role of ooplasmic segregation in mammalian development. *Developmental Biology* 203:199-204.
44. Eyal-Giladi H. (1997): Establishment of the axis in chordates: facts and speculations. *Development* 124(12):2285-2296.
45. Fleming TP. (1987): A quantitative analysis of cell allocation to trophectoderm and inner cell mass in the mouse blastocyst. *Dev Biol* 119(2):520-531.
46. Fleming TP. (1992): Trophectoderm biogenesis in the preimplantation mouse embryo. In: *Epithelial Organization and Development* (TP Fleming, ed) London: Chapman und Hall:111-136,.
47. Fleming TP, Garrod DR., Elsmore AJ. (1991): Desmosome biogenesis in the mouse preimplantation embryo. *Development* 112(2):527-539.
48. Fleming TP., Warren PD., Chisholm JC., Johnson MH. (1984): Trophectodermal processes regulate the expression of totipotency within the inner cell mass of the mouse expanding blastocyst. *J Embryol Exp Morphol* 84(2):63-90.
49. Fleming TP., Wilkins A., Mears A., Miller DJ., Thomas F., Ghassemifar MR., Fesenko I., Sheth B., Kwong WY., Eckert JJ. (2004): Society for Reproductive Biology Founders' Lecture 2003. The making of an embryo: short-term goals and long-term implications. *Reprod Fertil Dev* 16(3):325-337.
50. Gardner RL. (1982): Manipulation of the mouse blastocyst. Chapter from *Reproduction in mammals 2: Embryonic and fetal development*:161-170.
51. Gardner RL. (1997): The early blastocyst is bilaterally symmetrical and its axis of symmetry is aligned with the animal-vegetal axis of the zygote in the mouse. *Development* 124(2):289-301.
52. Gardner RL. (2001a): The initial phase of embryonic patterning in mammals. *Int Rev Cytol* 203:233-290.
53. Gardner RL. (2001b): Specification of embryonic axes begins before cleavage in normal mouse development. *Development* 128(6):839-847.
54. Gardner RL. (2006a): The axis of polarity of the mouse blastocyst is specified before blastulation and independently of the zona pellucida. *Hum Reprod*.
55. Gardner RL. (2006b): Weaknesses in the case against prepatterning in the mouse. *Reprod Biomed Online* 12(2):144-149.
56. Gardner RL, Davies TJ. (2002): Trophectoderm growth and bilateral symmetry of the blastocyst in the mouse. *Hum Reprod* 17(7):1839-1845.
57. Gardner RL, Davies TJ. (2006c): An investigation of the origin and significance of bilateral symmetry of the pronuclear zygote in the mouse. *Hum Reprod* 21(2):492-502.
58. Gardner RL, Papaioannou VE. (1975): Differentiation in the trophectoderm and inner cell mass. pp. 107-32. In: Balls M., Wild AE., *The early development of mammals* Cambridge, Cambridge Univ Press 1:16.
59. Geber S., Sampaio M. (1999): Blastomere development after embryo biopsy: a new model to predict embryo development and to select for transfer. *Hum Reprod* 14(3):782-786.

60. Gong DW., Bi S., Pratley RE., Weintraub BD. (1996): Genomic structure and promoter analysis of the human obese gene. *J Biol Chem* 271(8):3971-3974.
61. Gonzalez RR., Caballero-Campo P., Jasper M., Mercader A., Devoto L., Pellicer A., Simon C. (2000a): Leptin and Leptin Receptor Are Expressed in the Human Endometrium and Endometrial Leptin Secretion Is Regulated by the Human Blastocyst. *J Clin Endocrinol Metab* 85(12):4883-4888.
62. Gonzalez RR., Simon C., Caballero-Campo P., Norman R., Chardonnes D., Devoto L., Bischof P. (2000b): Leptin and reproduction. *Hum Reprod Update* 6(3):290-300.
63. Gurdon JB. (1992): The generation of diversity and pattern in animal development. *Cell* 68(2):185-199.
64. Hacker GW. (1992): Immunogold-Silver-Staining (IGSS) und Silberazetat-Autometallographie. *MTA* 7:579-586.
65. Hancock SN., Agulnik SI., Silver LM., Papaioannou VE. (1999): Mapping and expression analysis of the mouse ortholog of Xenopus Eomesodermin. *Mech Dev* 81(1-2):205-208.
66. Handyside AH. (1978): Time of commitment of inside cells isolated from preimplantation mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol* 45:37-53.
67. Hansis C., Grifo JA., Krey LC. (2000): Oct-4 expression in inner cell mass and trophectoderm of human blastocysts. *Mol Hum Reprod* 6(11):999-1004.
68. Hansis C., Grifo JA., Krey LC. (2004): Candidate lineage marker genes in human preimplantation embryos. *Reprod Biomed Online* 8(5):577-583.
69. Hansis C., Tang YX., Grifo JA., Krey LC. (2001): Analysis of Oct-4 expression and ploidy in individual human blastomeres. *Mol Hum Reprod* 7(2):155-161.
70. Herrler A., Beier HM. (2000): Early embryonic coats: morphology, function, practical applications. An overview. *Cells Tissues Organs* 166(2):233-246.
71. Hiiragi T., Solter D. (2004): First cleavage plane of the mouse egg is not predetermined but defined by the topology of the two apposing pronuclei. *Nature* 430(6997):360-364.
72. Hiiragi T., Solter D. (2005): Mechanism of first cleavage specification in the mouse egg: is our body plan set at day 0? *Cell Cycle* 4(5):661-664.
73. Hogan B., Tilly R. (1978): In vitro development of inner cell masses isolated immunosurgically from mouse blastocysts. II. Inner cell masses from 3.5- to 4.0-day p.c. blastocysts. *J Embryol Exp Morphol* 45:107-121.
74. Jackson BW., Grund C., Schmid E., Burki K., Franke WW., Illmensee K. (1980): Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. Intermediate filaments of the cytokeratin type and desmosomes in preimplantation embryos. *Differentiation* 17(3):161-179.
75. Johnson MH., Maro B., Takeichi M. (1986): The role of cell adhesion in the synchronization and orientation of polarization in 8-cell mouse blastomeres. *J Embryol exp Morph* 93:239-255.
76. Johnson MH., McConnell JML. (2004): Lineage allocation and cell polarity during mouse embryogenesis. *Sem Cell Dev Bio* 15: 583-597.
77. Johnson MH., Ziomek CA. (1981): The foundation of two distinct cell lineages within the mouse morula. *Cell* 24(1):71-80.
78. Johnson MH., Ziomek CA. (1983): Cell interactions influence the fate of mouse blastomeres undergoing the transition from the 16- to the 32-cell stage. *Dev Biol* 95(1):211-218.
79. Kawamura K., Sato N., Fukuda J., Kodama H., Kumagai J., Tanikawa H., Nakamura A., Tanaka T. (2002): Leptin promotes the development of mouse preimplantation embryos in vitro. *Endocrinology* 143(5):1922-1931.
80. Kawamura K., Sato N., Fukuda J., Kodama H., Kumagai J., Tanikawa H., Murata M., Tanaka T. (2003): The role of leptin during the development of mouse preimplantation embryos. *Mol Cell Endocrinol* 202(1-2):185-189.

81. Kervrann C., Legland D., Pardini L. (2004): Robust incremental compensation of the light attenuation with depth in 3D fluorescence microscopy. *J Microsc* 214(Pt 3):297-314.
82. Kirchhof N., Carnwath JW., Lemme E., Anastassiadis K., Schöler H., Niemann H. (2000): Expression pattern of oct-4 in preimplantation embryos of different species. *Biol Reprod* 63(6):1698-1705.
83. Kliem A, Tetens F., Niemann H., Fischer B. (1998): Only a Truncated Epidermal Growth Factor Receptor Protein Is Present in Porcine Endometrium. *Biology of Reproduction* 58:1367-1371.
84. Kline AD., Becker GW., Churgay LM., Landen BE., Martin DK., Muth WL., Rathnachalam R., Richardson JM., Schoner B., Ulmer M., Hale JE. (1997): Leptin is a four-helix bundle: secondary structure by NMR. *FEBS Lett* 407(2):239-242.
85. Klymkowsky MW., Maynell LA., Polson AG. (1987): Polar asymmetry in the organization of the cortical cyokeratin system of *Xenopus laevis* oocytes and embryos. *Development* 100(3):543-557.
86. Kunath T., Strumpf D., Rossant J. (2004): Early trophoblast determination and stem cell maintenance in the mouse--a review. *Placenta* 25 Suppl A:S32-38.
87. Laurent M., Johannin G., Gilbert N., Lucas L., Cassio D., Petit PX., Fleury A. (1994): Power and limits of laser scanning confocal microscopy. *Biol Cell* 80(2-3):229-240.
88. Lehtonen E., Lehto VP., Vartio T., Badley RA., Virtanen I. (1983): Expression of cyokeratin polypeptides in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Dev Biol* 100(1):158-165.
89. Markham KR., Gould KS., Ryan KG. (2001): Cytoplasmic accumulation of flavonoids in flower petals and its relevance to yellow flower colouration. *Phytochemistry* 58(3):403-413.
90. Markowska A., Malendowicz K., Drews K. (2004a): The role of leptin in breast cancer. *Eur J Gynaecol Oncol* 25(2):192-194.
91. Markowska A., Neri G., Hochol A., Nowak M., Nussdorfer GG., Malendowicz LK. (2004b): Effects of leptin and leptin fragments on steroid secretion and proliferative activity of regenerating rat adrenal cortex. *Int J Mol Med* 13(1):139-141.
92. Moore CA., Zernicka-Goetz M. (2005): PAR-1 and the microtubule-associated proteins CLASP2 and dynactin-p50 have specific localisation on mouse meiotic and first mitotic spindles. *Reproduction* 130(3):311-320.
93. Moore NW., Adams CE., Rowson LE. (1968): Developmental potential of single blastomeres of the rabbit egg. *J Reprod Fertil* 17(3):527-531.
94. Motosugi N., Bauer T., Polanski Z., Solter D., Hiiragi T. (2005): Polarity of the mouse embryo is established at blastocyst and is not prepatterned. *Genes Dev* 19(9):1081-1092.
95. Mottla GL., Adelman MR., Hall JL., Gindoff PR., Stillman RJ., Johnson KE. (1995): Lineage tracing demonstrates that blastomeres of early cleavage-stage human pre-embryos contribute to both trophectoderm and inner cell mass. *Hum Reprod* 10(2):384-391.
96. Mulnard J. (1955): Contribution à la connaissance des enzymes dans l'ontogénèse. Les phosphomonoestérases acide et alcaline dans le développement du Rat et de la Souris. *Arch Biol* 66:525-685.
97. Mulnard J. (1965): Aspects cytochimiques de la régulation in vitro de l'oeuf de souris après destruction d'un des blastomeres du stades II.I. La phosphomonoestérase acide. *Bull Arch roy Med Belg, Series 2*, 5:31-67.
98. Mulnard J., Dalqç AM. (1955): Les polysaccharides dans le développement de l'oeuf tubaire du Rat. *C R Soc Biol (Paris)* 149:836-839.

99. Nichols J., Gardner RL. (1984): Heterogeneous differentiation of external cells in individual isolated early mouse inner cell masses in culture. *J Embryol Exp Morphol* 80:225-240.
100. Niwa H., Toyooka Y., Shimosato D., Strumpf D., Takahashi K., Yagi R., Rossant J. (2005): Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell* 123(5):917-929.
101. Oberkofler H., Beer A., Breban D., Hell E., Krempler F., Patsch W. (1997): Human obese gene expression: alternative splicing of mRNA and relation to adipose tissue localization. *Obes Surg* 7(5):390-396.
102. Oshima RG., Howe WE., Klier FG., Adamson ED., Shevinsky LH. (1983): Intermediate filament protein synthesis in preimplantation murine embryos. *Dev Biol* 99(2):447-455.
103. Ovitt CE., Schöler HR. (1998): The molecular biology of Oct-4 in the early mouse embryo. *Mol Hum Reprod* 4(11):1021-1031.
104. Pacheco-Trigon S., Hennequet-Antier C., Oudin J-F., Piumi F., Renard J-P., Duranthon V. (2002): Molecular characterization of genomic activities at the onset of zygotic transcription in mammals. *Biol Reprod* 67(6):1907-1918.
105. Palmieri SL., Peter W., Hess H., Schöler H.R. (1994): Oct-4 Transcription Factor Is Differentially Expressed in the Mouse Embryo during Establishment of the First Two Extraembryonic Cell Lineages Involved in Implantation. *Dev Biol* 166:259-267.
106. Papaioannou VE. (1982): Lineage analysis of inner cell mass and trophectoderm using microsurgically reconstituted mouse blastocysts. *J Embryol Exp Morphol* 68:199-209.
107. Pedersen RA., Balakier, H. (1981): Cell Lineage and allocation in early mouse embryos. *J Cell Biol* 91:183 ?
108. Pedersen RA., Balakier H., Wu K. (1982): Cell Lineage Analysis of Mouse Embryos and the Origin of Inner Cell Mass an Trophoectoderm. *J Cell Biol* 95:163a ?
109. Pedersen RA., Wu K., Balakier H. (1986): Origin of the inner cell mass in mouse embryos: cell lineage analysis by microinjection. *Dev Biol* 117(2):581-595.
110. Piotrowska K., Wianny F., Pedersen RA., Zernicka-Goetz M. (2001a): Blastomeres arising from the first cleavage division have distinguishable fates in normal mouse development. *Development* 128(19):3739-3748.
111. Piotrowska K., Zernicka-Goetz M. (2001b): Role for sperm in spatial patterning of the early mouse embryo. *Nature* 409(6819):517-521.
112. Piotrowska K., Zernicka-Goetz M. (2002): Early patterning of the mouse embryo--contributions of sperm and egg. *Development* 129(24):5803-5813.
113. Plancha CE., Carmo-Fonseca M., David-Ferreira JF. (1989): Cytokeratin filaments are present in golden hamster oocytes and early embryos. *Differentiation* 42(1):1-9.
114. Plusa B., Hadjantonakis AK., Gray D., Piotrowska-Nitsche K., Jedrusik A., Papaioannou VE., Glover DM., Zernicka-Goetz M. (2005): The first cleavage of the mouse zygote predicts the blastocyst axis. *Nature* 434(7031):391-395.
115. Reima I., Lehtonen E., Virtanen I., Flechon JE. (1993): The cytoskeleton and associated proteins during cleavage, compaction and blastocyst differentiation in the pig. *Differentiation* 54(1):35-45.
116. Rigaut JP., Vassy J. (1991): High-resolution three-dimensional images from confocal scanning laser microscopy. Quantitative study and mathematical correction of the effects from bleaching and fluorescence attenuation in depth. *Anal Quant Cytol Histol* 13(4):223-232.
117. Rohen JW., Lütjen-Drecoll E. (2002): Funktionelle Embryologie, Schattuaer Verlag, 2. Auflage
118. Rossant J. (2004): Lineage development and polar asymmetries in the peri-implantation mouse blastocyst. *Semin Cell Dev Biol* 15(5):573-581.

119. Rossant J., Guillemot F., Tanaka M., Latham K., Gertenstein M., Nagy A. (1998): Mash2 is expressed in oogenesis and preimplantation development but is not required for blastocyst formation. *Mech Dev* 73(2):183-191.
120. Saito N., Konishi K., Takeda H., Kato M., Sugiyama T., Asaka M. (2003): Antigen retrieval trial for post-embedding immunoelectron microscopy by heating with several unmasking solutions. *J Histochem Cytochem* 51(8):989-994.
121. Sato M., Muramatsu T. (1987): Properties of smaller and larger cells from the 16-cell mouse embryo: increase in cell adhesiveness in the smaller cells cultured up to late 16-cell stage. *Cell Struct Funct* 12(4):401-406.
122. Schulz LC., Widmaier EP. (2004): The effect of leptin on mouse trophoblast cell invasion. *Biol Reprod* 71(6):1963-1967.
123. Scott L. (2003): The biological basis of non-invasive strategies for selection of human oocytes and embryos. *Hum Reprod Update* 9(3):237-249.
124. Seidel F. (1952): Die Entwicklungspotenzen einer isolierten Blastomere des Zweizellenstadiums im Säugetierei. *Die Naturwissenschaften* 39:355-356.
125. Seidel F. (1960): Die Entwicklungsfähigkeiten isolierter Furchungszellen aus dem Ei des Kaninchens *Oryctolagus cuniculus*. *Wilhelm Roux' Arch Entwicklungsmech Organismen* 152: 43-130
126. Shome B., Parlow AF. (1973): The primary structure of the hormone-specific, beta subunit of human pituitary luteinizing hormone (hLH). *J Clin Endocrinol Metab* 36(3):618-621.
127. Smith A. (2005): The battlefield of pluripotency. *Cell* 123(5):757-760.
128. Spemann H., Mangold H. (1924): Über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. *Archiv für mikroskopische Anatomie u Entwicklungsmechanik* 100:599-638.
129. Spindle AI. (1978): Trophoblast regeneration by inner cell masses isolated from cultured mouse embryos. *J Exp Zool* 203(3):483-489.
130. Staf T., Herrero J., Mehnert C., Manolopoulos K., Lenhard A., Gips H. (2002): Influence of polarization effects in ooplasm and pronuclei on embryo quality and implantation in an IVF program. *J Assist Reprod Genet* 19(8):355-362.
131. Stewart F., Charleston B., Crossett B., Barker P.J., Allen WR. (1995): A novel uterine protein that associates with the embryonic capsule in equids. *Journal of Reproduction and Fertility* 105:65-70.
132. Strumpf D., Mao CA., Yamanaka Y., Ralston A., Chawengsaksophak K., Beck F., Rossant J. (2005): Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophoblast in the mouse blastocyst. *Development* 132(9):2093-2102.
133. Swain JE., Dunn RL., McConnell D., Gonzalez-Martinez J., Smith GD. (2004): Direct effects of leptin on mouse reproductive function: regulation of follicular, oocyte, and embryo development. *Biol Reprod* 71(5):1446-1452.
134. Talmadge K., Boorstein WR., Fiddes JC. (1983): The human genome contains seven genes for the beta-subunit of chorionic gonadotropin but only one gene for the beta-subunit of luteinizing hormone. *DNA* 2(4):281-289.
135. Tarkowski AK., Wroblewska J. (1967): Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. *J Embryol Exp Morphol* 18(1):155-180.
136. Torres-Padilla ME., Parfitt DE., Kouzarides T., Zernicka-Goetz M. (2007): Histone arginine methylation regulates pluripotency in the early mouse embryo. *Nature* 445(7124):214-218.
137. Turner K., Horobin, RW. (1997): Permeability of the mouse zona pellucida: a structure-staining-correlation model using coloured probes. *J Reprod Fert* 111:259-265.
138. Vinot S., Le T., Ohno S., Pawson T., Maro B., Louvet-Vallee S. (2005): Asymmetric distribution of PAR proteins in the mouse embryo begins at the 8-cell stage during compaction. *Dev Biol* 282(2):307-319.

139. Wartenberg M., Acker H. (1995): Quantitative recording of vitality patterns in living multicellular spheroids by confocal microscopy. *Micron* 26(5):395-404.
140. Wiley LM. (1978): Apparent trophoblast giant cell production in vitro by core cells isolated from cultured mouse inner cell masses. *J Exp Zool* 206(1):13-16.
141. Winkel GK., Pedersen RA. (1988): Fate of the inner cell mass in mouse embryos as studied by microinjection of lineage tracers. *Dev Biol* 127(1):143-156.
142. Yoon SJ., Cha KY., Lee KA. (2005): Leptin receptors are down-regulated in uterine implantation sites compared to interimplantation sites. *Mol Cell Endocrinol* 232(1-2):27-35.
143. Zernicka-Goetz M. (1998): Fertile offspring derived from mammalian eggs lacking either animal or vegetal poles. *Development* 125(23):4803-4808.
144. Zernicka-Goetz M. (2002): Patterning of the embryo: the first spatial decisions in the life of a mouse. *Development* 129(4):815-829.
145. Zernicka-Goetz M. (2004): First cell fate decisions and spatial patterning in the early mouse embryo. *Semin Cell Dev Biol* 15(5):563-572.
146. Zernicka-Goetz M. (2006): The first cell-fate decisions in the mouse embryo: destiny is a matter of both chance and choice. *Curr Opin Genet Dev* 16(4):406-412.
147. Ziomek CA., Johnson MH., Handyside AH. (1982): The developmental potential of mouse 16-cell blastomeres. *J Exp Zool* 221(3):345-355.

7. Anhang

7.1 Abbildungen

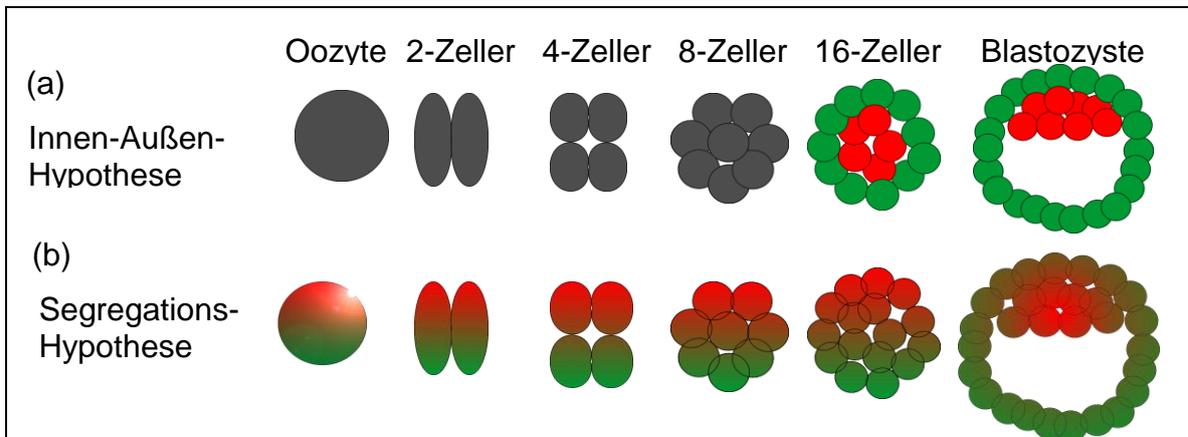


Abbildung 1:

Innen-Außen- und Segregationshypothese versuchen die Entstehung von ICM und Trophoblast zu erklären. Nach der Innen-Außen-Hypothese (a) sind die Blastomeren der Furchungsstadien zunächst äquivalent (hier homogen dunkelgrün), z.B. im 16-Zellstadium verlieren dann einige Zellen den Kontakt zur äußeren Oberfläche und entwickeln durch eben diese Innenlage ein anderes Expressionsmuster und werden zur ICM (rot), während die außen verbleibenden zum Trophoblasten werden (hellgrün).

Nach der Segregationshypothese (b) bestehen von der Oozyte an zytoplasmatische Gradienten z.B. von Morphogenen (rot-grün dargestellt), die im Rahmen der Furchungsteilungen ungleich auf die Blastomeren verteilt werden. Der rote Pol wird im gezeigten Beispiel zum Embryonalpol.

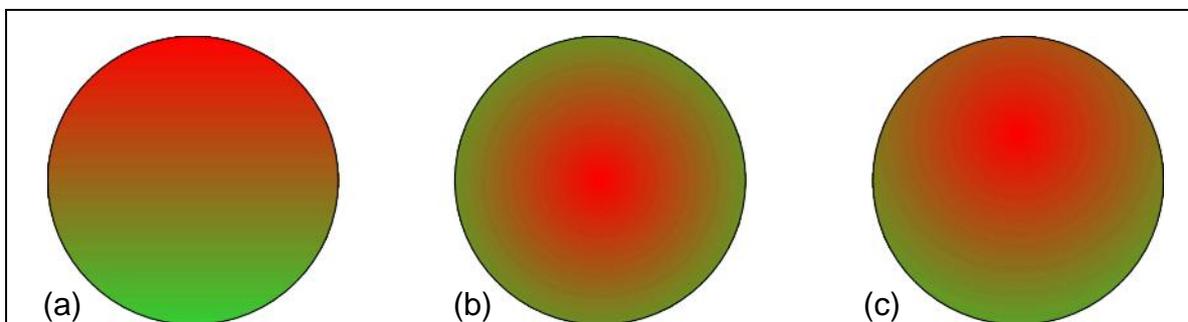


Abbildung 2:

Schema zu möglichen Verlaufsformen eines Faktorgradienten der Oozyte oder Zygote.

(a): Total exzentrischer Gradient

(b): Radiärsymmetrisch-konzentrischer Gradient

(c): Radiärsymmetrisch-exzentrischer Gradient

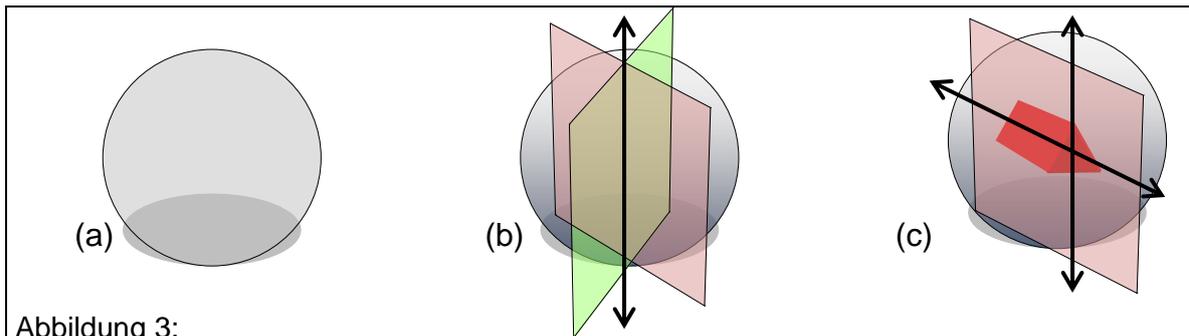


Abbildung 3:

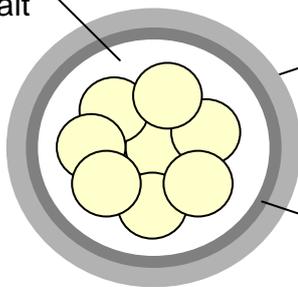
Schema zu Symmetriefformen bei dreidimensionalen Objekten.

(a): Kugelsymmetrie: Ein homogene Kugel lässt sich an Ebenen beliebiger Orientierung spiegeln. Man könnte beliebig viele Spiegelebenen einzeichnen.

(b): Radiärsymmetrie: Eine Kugel mit einer Achse (hier senkrecht von oben nach unten verlaufend) lässt sich nur an Ebenen (rot/grün) spiegeln, die durch diese Achse verlaufen.

(c): Bilateral- oder Spiegelsymmetrie: Eine Kugel mit zwei Achsen (hier die aus (b) und die Achse, die durch den zum Betrachter weisenden roten Dreieckszylinder vorgegeben wird) lässt sich nur noch an einer Ebene (rot) spiegeln.

Perivitelliner Spalt



Mukoproteidschicht

Zona pellucida

Abbildung 4:

Schematische Darstellung eines 8-Zellers mit dem ihn umgebenden perivitellinen Spalt, der Zona pellucida und der Mukoproteidschicht, die ihre Dicke im Laufe der Entwicklung deutlich verändert (s. diesbzgl. Diskussionskapitel) und hier relativ dünn dargestellt ist.

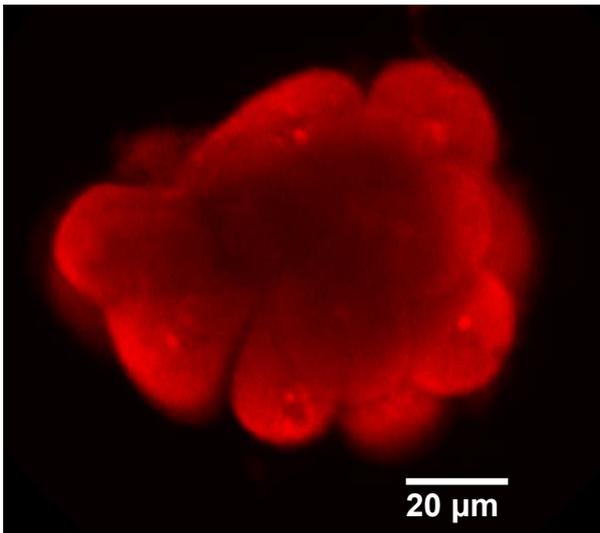


Abbildung 5:

Gezeigt ist ein repräsentativer virtueller Schnitt aus der Mitte einer 56 Stunden alten Kaninchenmorula. Es wurde eine Leptin-Immunhistochemie am Ganzpräparat durchgeführt. Erstantikörperkonzentration 1:100, Zweitantikörperkonzentration (Alexa 546) 1:200. Die Hüllen sind vollständig abgedaut, der Embryo (dadurch) leicht entrundet. Das Leptinsignal ist auf diesem Schnitt recht homogen radiärsymmetrisch verteilt, d.h. in allen äußeren Blastomeren mit Betonung der subapikalen Membran gleich verteilt. In den inneren Zellen kommt kaum Leptin zur Darstellung. Das Verteilungsmuster orientiert sich nicht offenkundig an Zellmembranen.

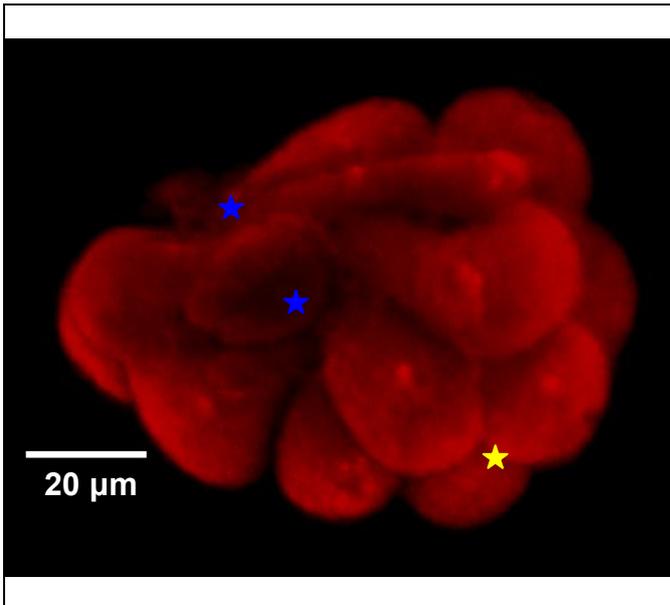


Abbildung 6:

Dreidimensionale Rekonstruktion des in Abbildung 5 dargestellten Embryos aus 52 einzelnen Scans im Abstand von jeweils 1,5 µm. Hier hat man im Gegensatz zum einzelnen virtuellen Schnitt den Eindruck, dass das Leptinsignal nicht um die gesamte Zirkumferenz gleich verteilt ist, sondern, dass ein leptinreicher (gelbes Sternchen) und ein leptinreicher (blaues Sternchen) vorzuliegen scheinen.

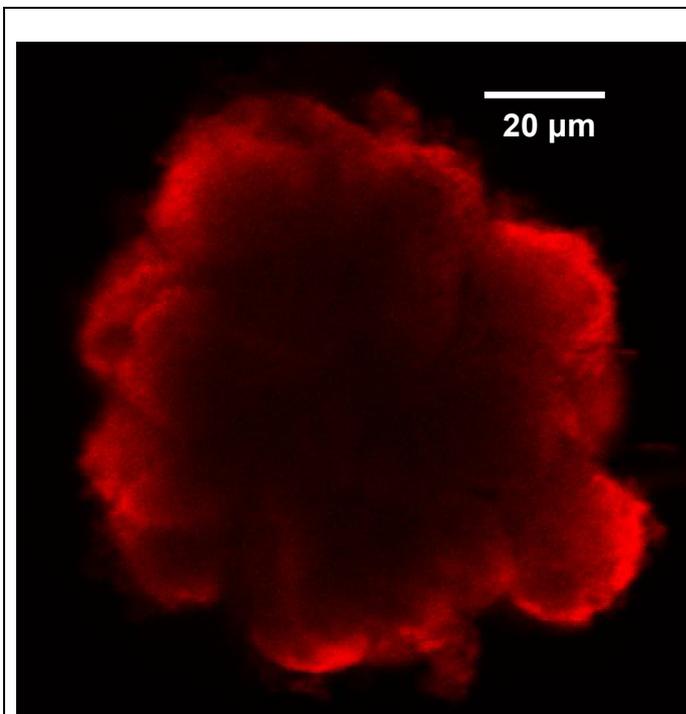


Abbildung 7:

Nach gleichem Protokoll, aber mit einem anderen Leptinestantikörper behandeltes Ganzpräparat. Außerdem sind bei diesem Embryo Reste der nicht vollständig abgedauten Hüllen auf den Blastomeren verblieben. Hier ein virtueller Schnitt etwa aus der Mitte des Embryos. Der Scan wurde mit einem etwas größeren Abstand der virtuellen Schnittebenen (2,35 µm) gemacht, was den Eindruck einer unregelmäßigen Blastomerenoberfläche verstärkt. Das Verteilungsmuster entspricht in seinen Grundzügen aber den bei Abb. 5 beschriebenen. Eine leptinreiche Domäne ist nicht eindeutig auszumachen.

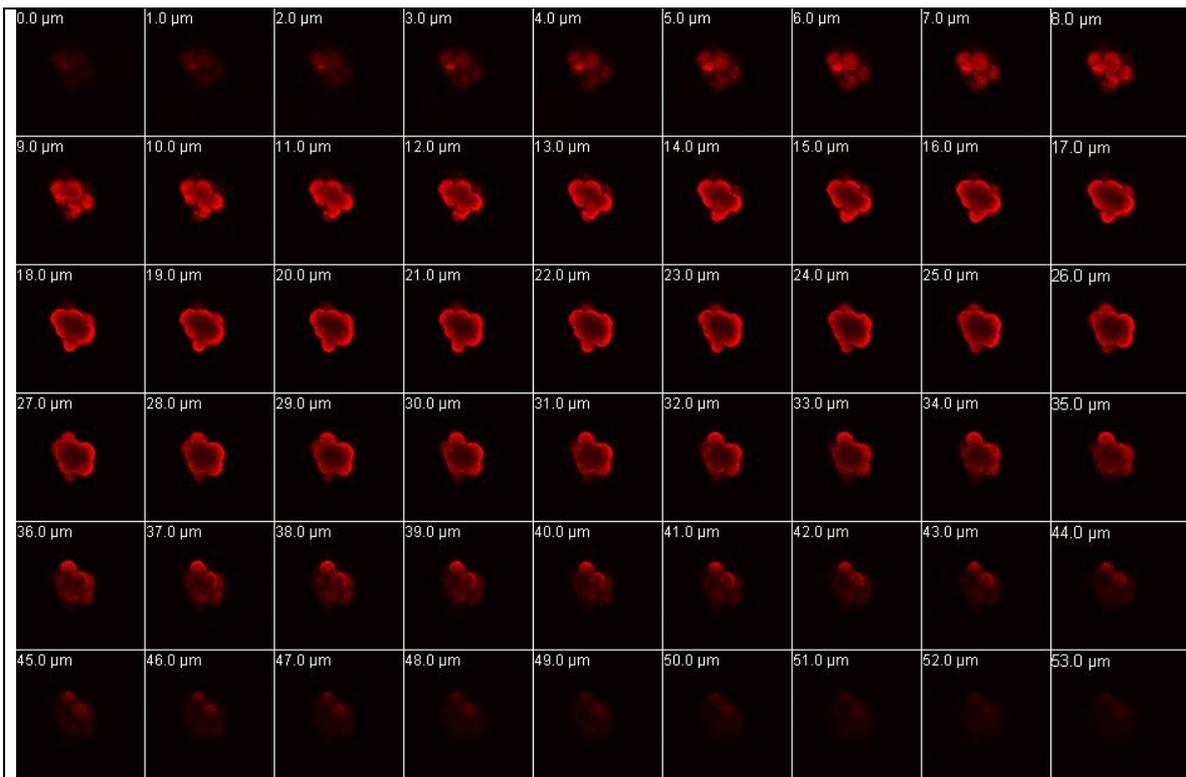


Abbildung 8:
Vollständige Serie der virtuellen Schnitte einer 56 Stunden alten Kaninchenmorula mit Leptin-Immunhistochemie (Ganzpräparat).

Abbildung 9 s.S.80

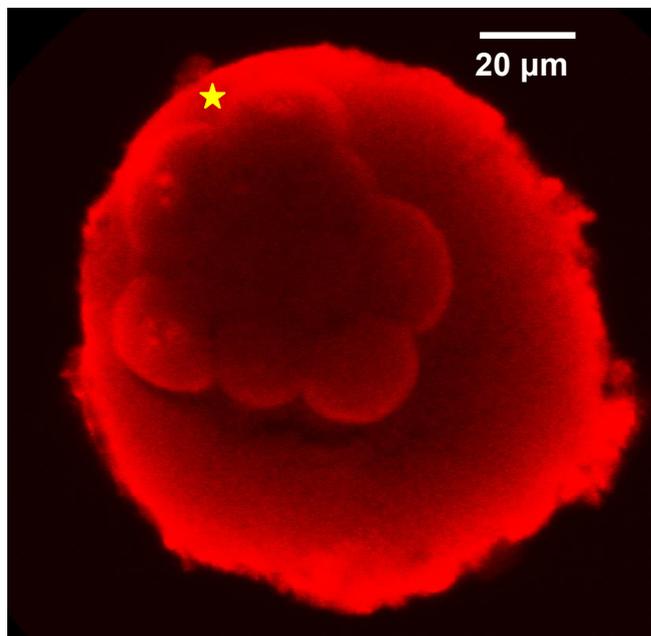


Abbildung 10 :
Morula aus derselben Versuchsreihe wie in Abb. 8 und 9, jedoch mit teilweise erhaltenen Hüllenstrukturen. Die deutliche Färbung der Hüllen ist einerseits durch deren hohe unspezifische Proteinbindungskapazität zu erklären, kann aber auch durch in den Hüllen enthaltenes Leptin bedingt sein (s. Realschnitte 3.3 & Diskussion). Die Überlagerung der Signale von Embryo und Hüllen (gelbes Sternchen) macht Aussagen über eine eventuelle leptinreiche Domäne hier schwierig.

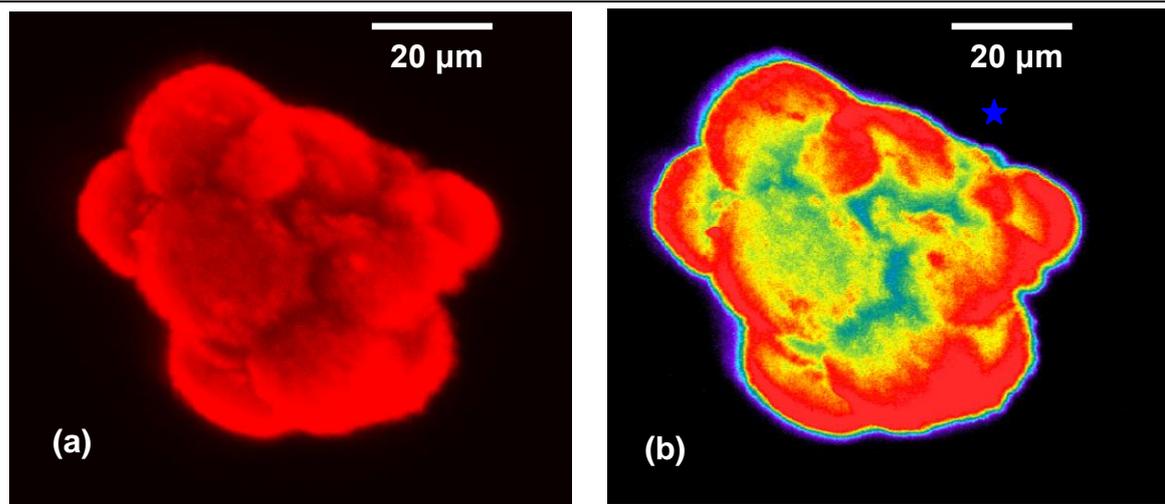


Abbildung 9:

Dreidimensionale Rekonstruktion der Morula aus Abb. 8. Links (a) in Originalfarben, rechts (b) als Falschfarbendarstellung, bei der rot maximale, gelb mittlere und grün-blau minimale Signalintensität codiert. Das blaue Sternchen markiert eine kleine leptinärmere Domäne an der Oberfläche der Morula bei insgesamt relativ homogener Signalverteilung. (c) Seitliche Ansicht der Rekonstruktion des Embryos, wobei die Frontansicht aus Abb. (a) hier die rechte Seite ist.

Der verschwommene Eindruck entsteht durch die Interpolierung der, zwischen zwei gemessenen Intensitäten liegenden, Werte. Deutlich wird auch, dass der Embryo zwischen Objektträger und Deckglas stark abgeplattet worden ist. Die (kleine) leptinarme Domäne ist hier nicht erkennbar.

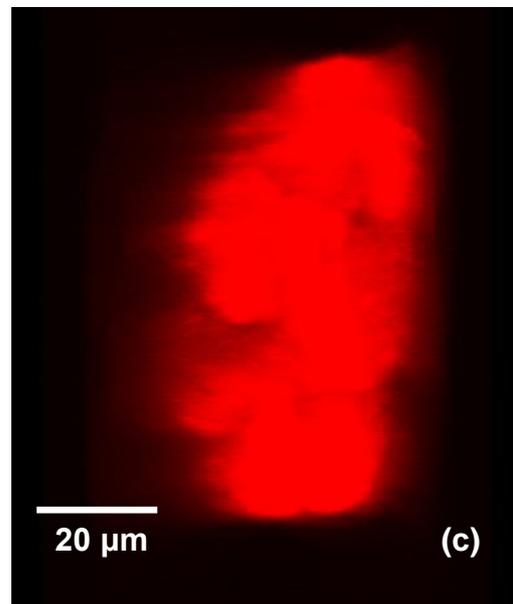
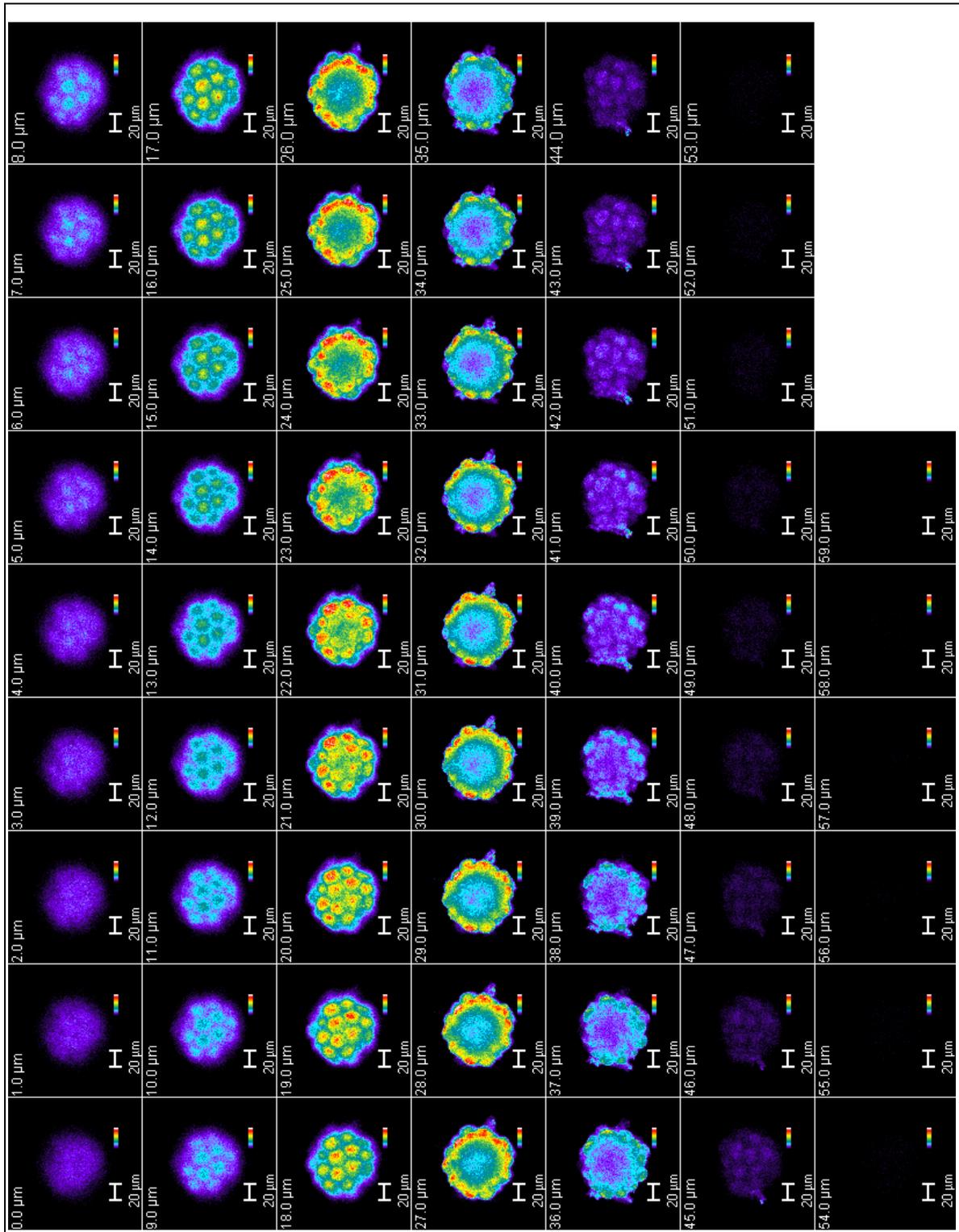


Abbildung 11:
 Späte Morula
 (69h p.c.), Leptin-
 darstellung am
 Ganzp-räparat,
 Abstand der
 virtuellen Schnitte
 ist 1 μm . Signal-
 intensität als
 Falsch-
 farbencode (s.
 Balken im Bild).



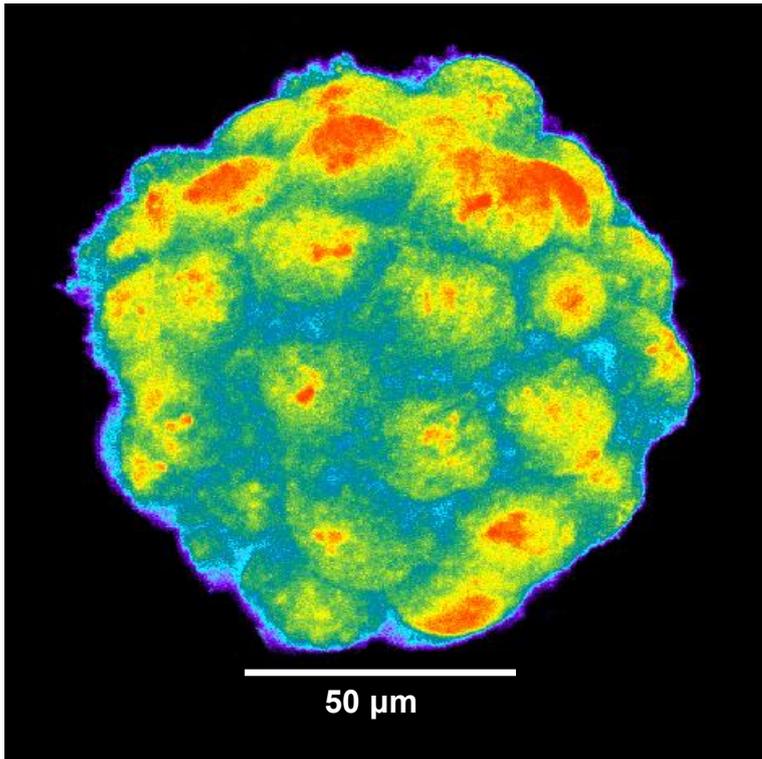


Abbildung 12:
 Dreidimensionale
 Rekonstruktion nach
 Abb. 11. Im Bereich
 zwischen 11 und 1
 Uhr fällt eine
 leptinreiche Domäne
 (rot) auf.

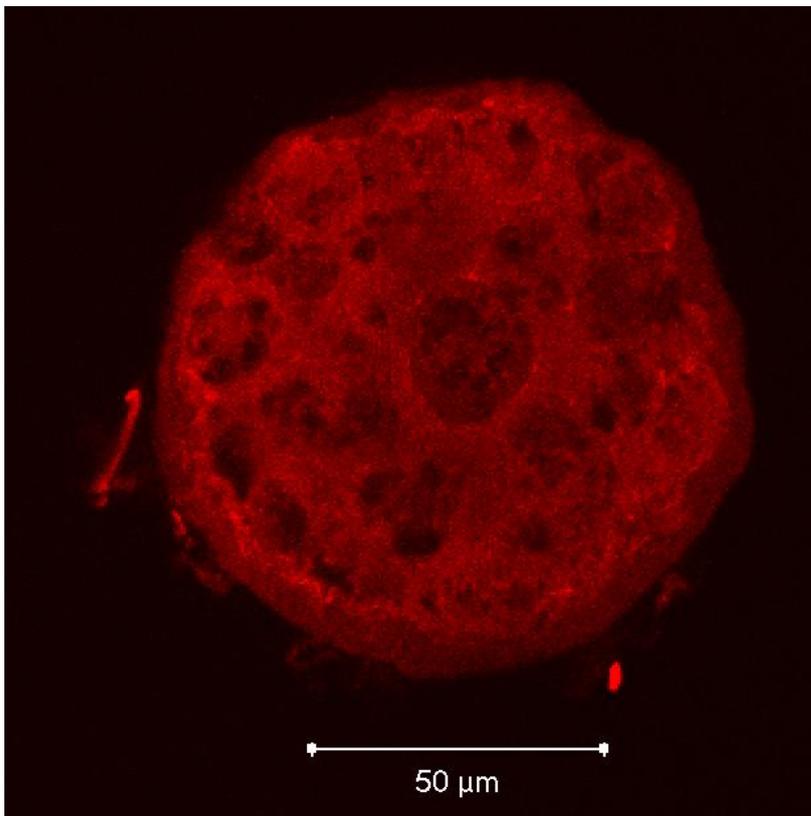


Abbildung 13:
 Embryo aus
 derselben
 Versuchsserie wie in
 Abb. 11 und 12, aber
 mit Aktin-Phalloidin-
 TRITC-Darstellung.
 Hier ein virtueller
 Schnitt (55,2 μm
 Tiefe). Neben der
 erwartungsgemäßen
 Aktinverteilung
 (netzartig, Kerne
 ausgespart,
 membrannahe Areale
 prominent, s. Albertini
 et al. 1987) imponiert
 v.a. die Homogenität
 des Signals im
 Inneren und Äußeren
 des Embryos.

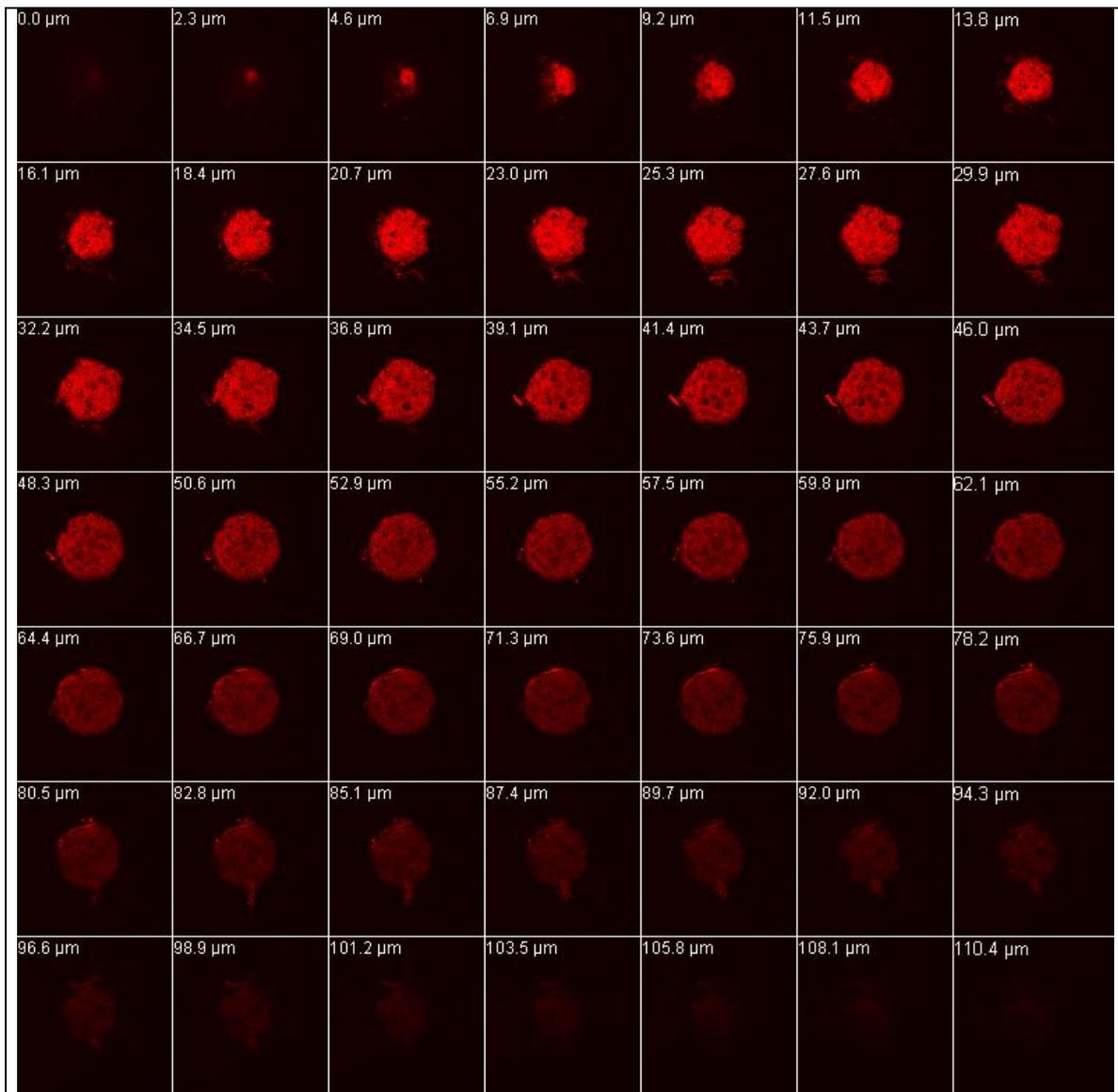


Abbildung 14:

Vollständige Serie der virtuellen CLSM-Schnitte zu Abb. 13 und 15. Bei zuverlässiger Darstellung der Aktinverteilung bis zu einer Eindringtiefe von etwa 55 μm , bläst das Signal jenseits davon (bei weiterhin erhaltenem gleichem Muster innerhalb des einzelnen Schnitts) deutlich ab, ohne dass hierfür eine Änderung der Aktinverteilung zu unterstellen wäre. Stark fluoreszierende bizarre Strukturen an der Oberfläche der Embryonen sind Reste der unvollständig abgedauten Hüllen.

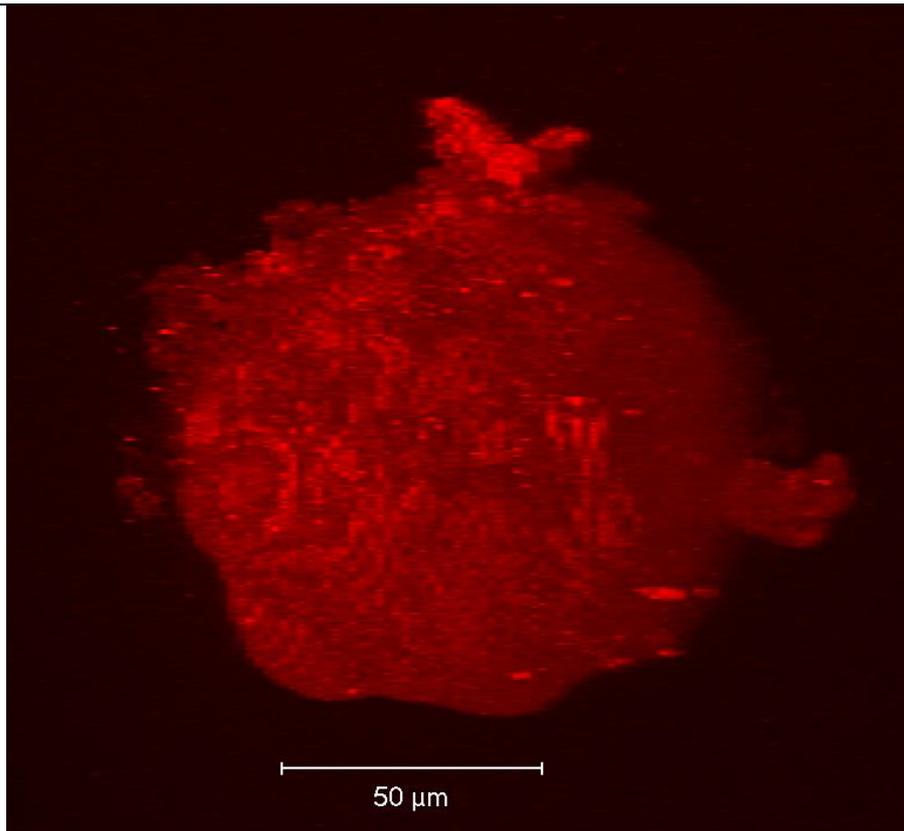


Abbildung 15:
Dreidimensionale
Rekonstruktion
der zuvor
beschrieben
Morula aus
virtuellen
Schnitten.

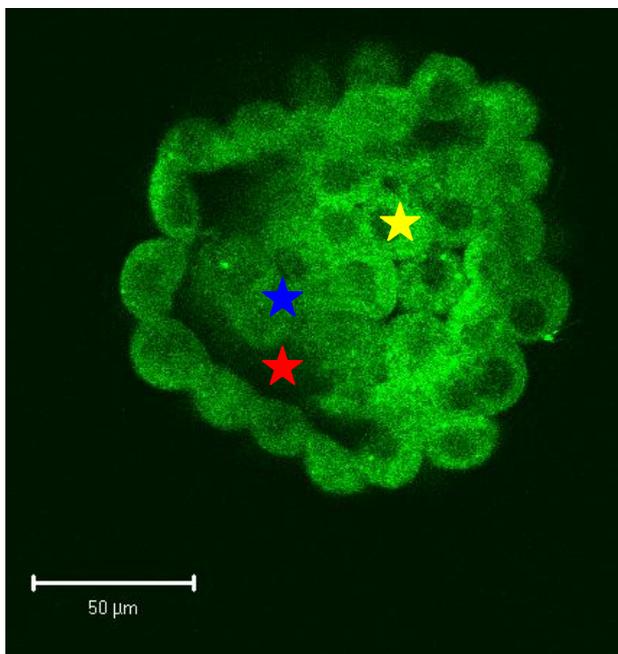


Abbildung 16:
Frühe Blastozyste mit
immunhistochemischer
Zytokeratindarstellung am
Ganzpräparat.
Alle Blastomeren zeigen hier
Zytokeratin-Expression. In
früheren Stadien gelang noch
kein Zytokeratinnachweis. Die
Blastozyste ist kollabiert, so dass
das Restlumen der
Blastozystenöhle (rotes
Sternchen) schmal ist. Dadurch
werden (stark angefärbte) Zellen
des muralen Trophoblasten
(gelbes Sternchen) hier z.T. flach
angeschnitten und scheinen
artefiziell in den Bereich der ICM
(blaues Sternchen) verlagert zu
sein, wie die gesamte
Schnittserie (Abb. 18) und die
seitliche Rekonstruktion (Abb. 17)
zeigt. Vgl. auch Diskussion im
Text (Kap. 4.1.2).

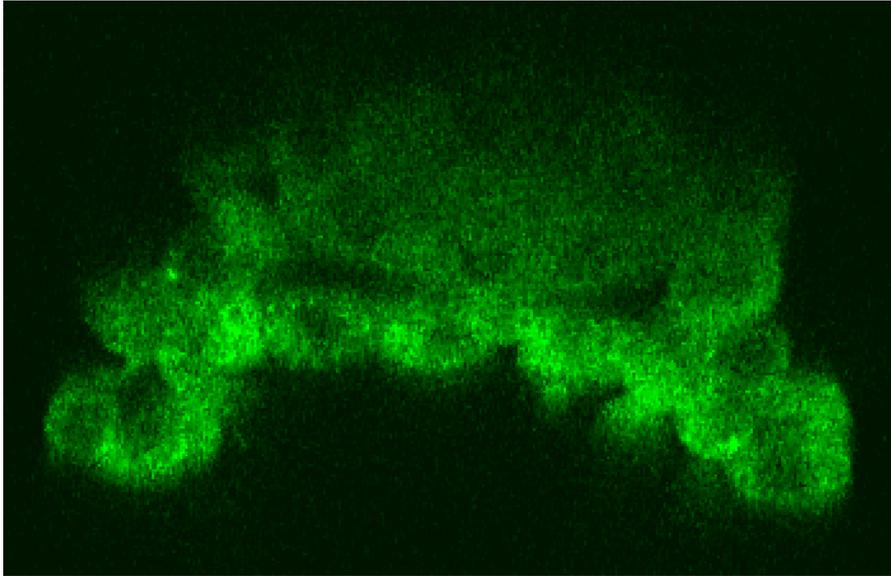
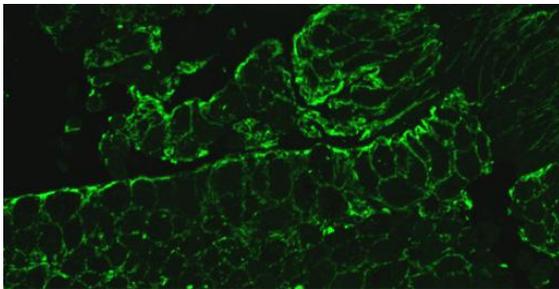


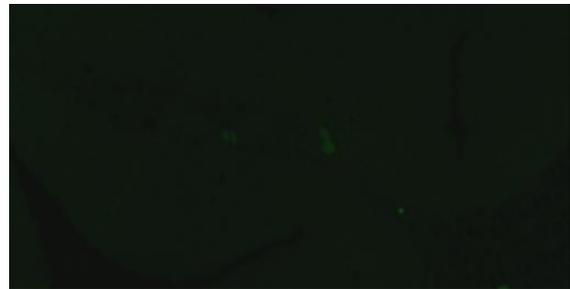
Abbildung 17:

Seitliche Ansicht der kollabierten Blastozyste aus Abb. 16. Embryoblast oben (verschwommen da laserabgewandt gelegen), muraler abembryonaler Trophoblast unten, Blastozystenhöhle weitgehend kollabiert. Leichte Betonung des Zytokeratin-Signals im abembryonalen Trophoblasten

Abbildung 18 s.S.86



(a)



(b)

Abbildung 19:

(a) (Para)formaldehydfixierter Kryostatschnitt des Kaninchenuterus, der mit Anti-Pan-Zytokeratin-Erstantikörper behandelt wurde. Es kommt deutlich ein intraepitheliales netzartiges Signal mit subapikaler Betonung, wie es für Zytokeratine typisch ist, zur Darstellung.

(b) Zugehörige Negativkontrolle, die bei Inkubation mit Rinderserumalbumin statt mit Erstantikörper ansonsten vollkommen identisch behandelt wurde.

<u>Abbildung 18:</u> Schnittserie zu der in den Abb. 16 und 17 gezeigten Blastozyste. Man bemerke das Abblassen ab etwa 50 µm Eindringtiefe.	0.0 µm	1.4 µm	2.8 µm	4.2 µm	5.6 µm	7.0 µm	8.4 µm	9.8 µm	11.2 µm	12.6 µm
	14.0 µm	15.4 µm	16.8 µm	18.2 µm	19.6 µm	21.0 µm	22.4 µm	23.8 µm	25.2 µm	26.6 µm
	28.0 µm	29.4 µm	30.8 µm	32.2 µm	33.6 µm	35.0 µm	36.4 µm	37.8 µm	39.2 µm	40.6 µm
	42.0 µm	43.4 µm	44.8 µm	46.2 µm	47.6 µm	49.0 µm	50.4 µm	51.8 µm	53.2 µm	54.6 µm
	56.0 µm	57.4 µm	58.8 µm	60.2 µm	61.6 µm	63.0 µm	64.4 µm	65.8 µm	67.2 µm	68.6 µm
	70.0 µm	71.4 µm	72.8 µm	74.2 µm	75.6 µm	77.0 µm	78.4 µm	79.8 µm	81.2 µm	82.6 µm
	84.0 µm	85.4 µm	86.8 µm	88.2 µm	89.6 µm					

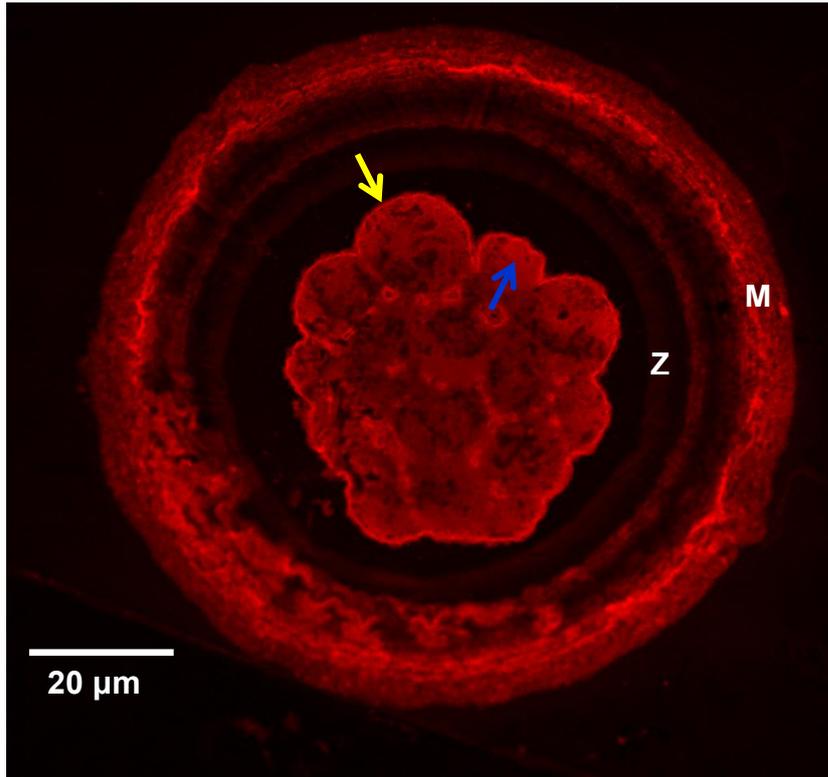


Abbildung 20:

Leptindarstellung an einem repräsentativen histologischen Realschnitt etwa durch die Mitte einer 54 Stunden alten Morula. Besonders auffallend ist dezidierte Markierung entlang der Blastomerenoberfläche (gelber Pfeil). Auch innerhalb des Zytoplasmas subapikal ist aber das Signal angereichert (blauer Pfeil).

Z: Zona pellucida; M: Mukoproteidschicht

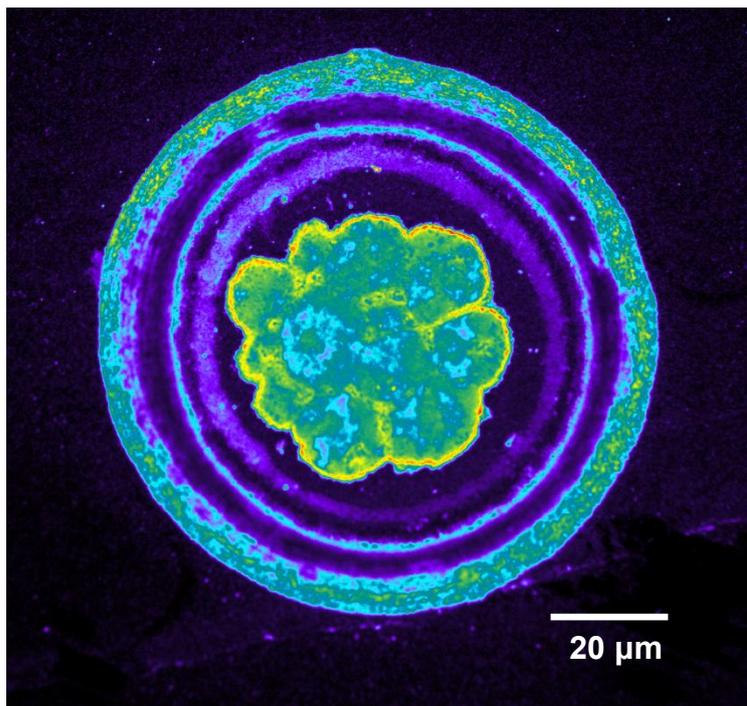


Abbildung 21:

Leptindarstellung an einer 54 alten Morula am histologischen Realschnitt in Falschfarbendarstellung. Zum Falschfarbencode vgl. Abb. 11.

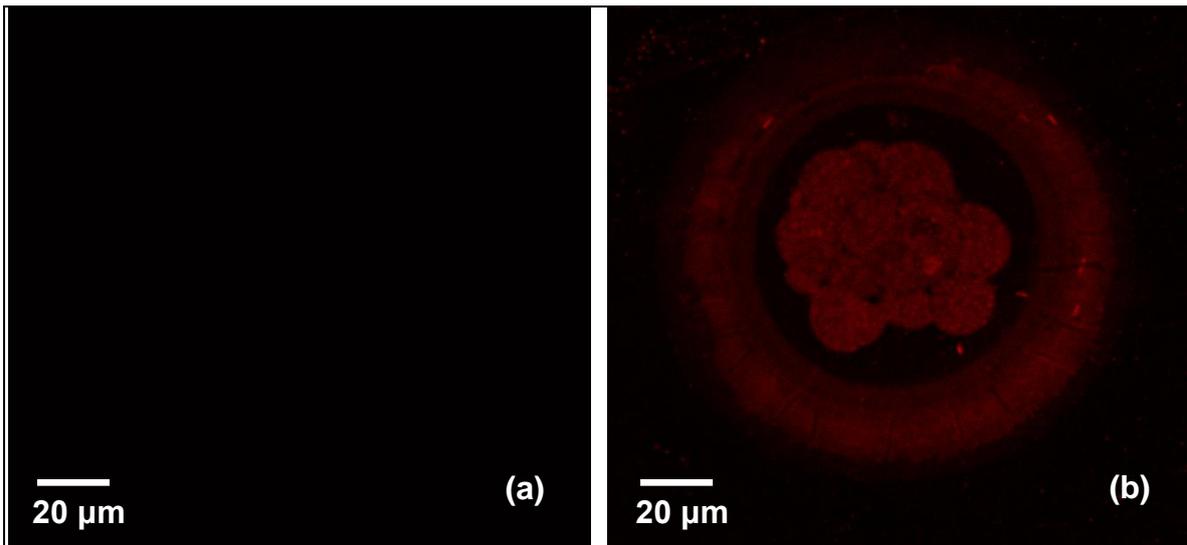


Abbildung 22:

Negativkontrolle zur Leptin-IHC am histologischen Realschnitt unter Verwendung von PBS statt Erstantikörper an einer 54 Stunden alten Morula: Bei Verwenden identischer Scanparameter war keinerlei Signal detektierbar (a). Nur nach Erhöhung der Empfindlichkeit (Detector Gain) erkennt man den undifferenziert gefärbten Embryo (b) mit gleichermaßen flau angefärbten Hüllen.

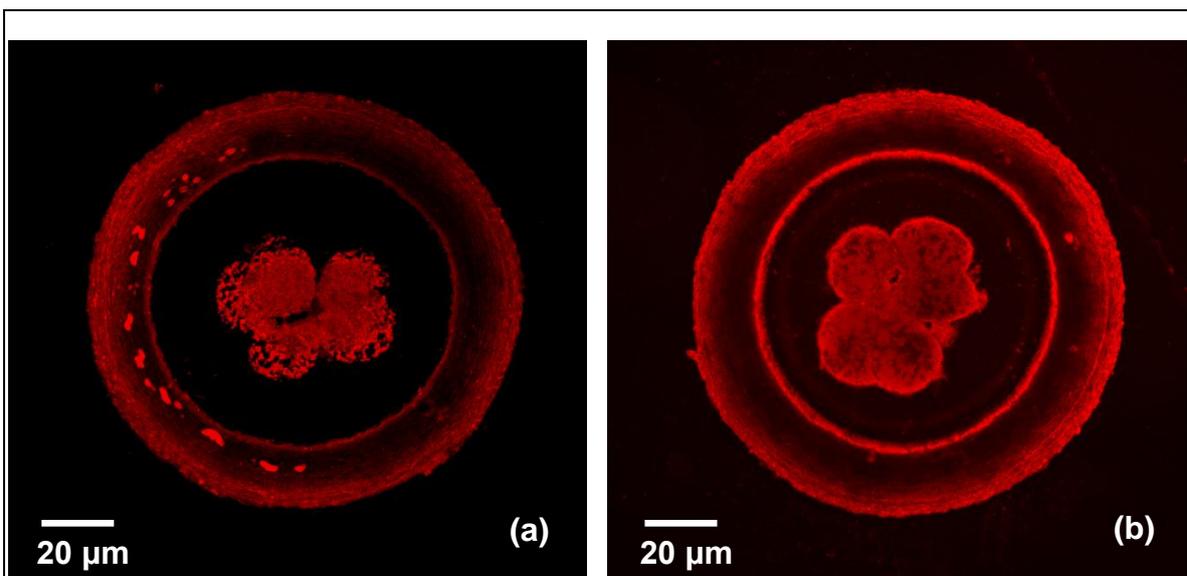


Abbildung 23:

Negativkontrolle zur Leptin-IHC am histologischen Realschnitt (54 Stunden alte Morula) unter Verwendung von Leptin-präabsorbiertem Erstantikörper (a): Im Vergleich zum Hauptversuch (b) zeigte diese Präabsorptions-Kontrolle ein Ausbleiben der Reaktion entlang der Blastomerenoberfläche, innerhalb der äußeren Blastomeren (intrazytoplasmatischer Halbmond) sowie in den innersten Abschnitten der Mukoproteidschicht an der Grenze zur Zona pellucida (spezifische Reaktion). Dagegen verbleibt Fluoreszenz diffus im Zytoplasma und in den äußeren Schichten der Blastozystenwänden. Diese ist demnach als unspezifische Antikörperbindung anzusehen. Die teils schollenartigen Anfärbungen in den Wänden sind durch artefaktische Aufwerfungen und Überlagerungen des Schnitts bedingt.

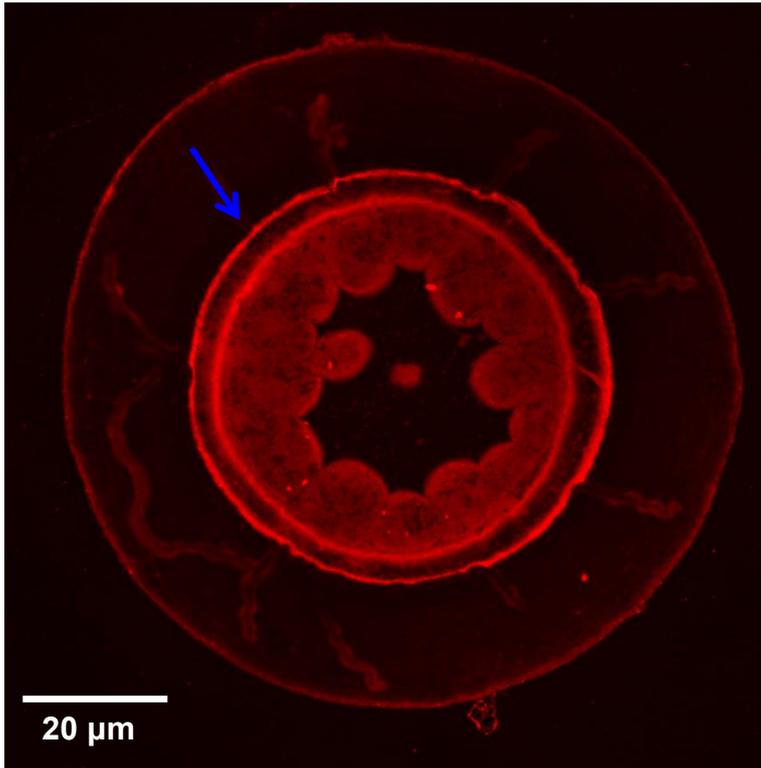


Abbildung 24:
 Leptin-IHC an einer 69h alten (sehr) frühen Blastozyste. Das Verteilungsmuster entspricht weitgehend dem bei der Morula beschriebenen. Zusätzlich zeigt das Präparat das häufig beobachtete ringförmige Signal in den innersten Abschnitten der Mukoproteidschicht an der Grenze zur Zona pellucida (blauer Pfeil).

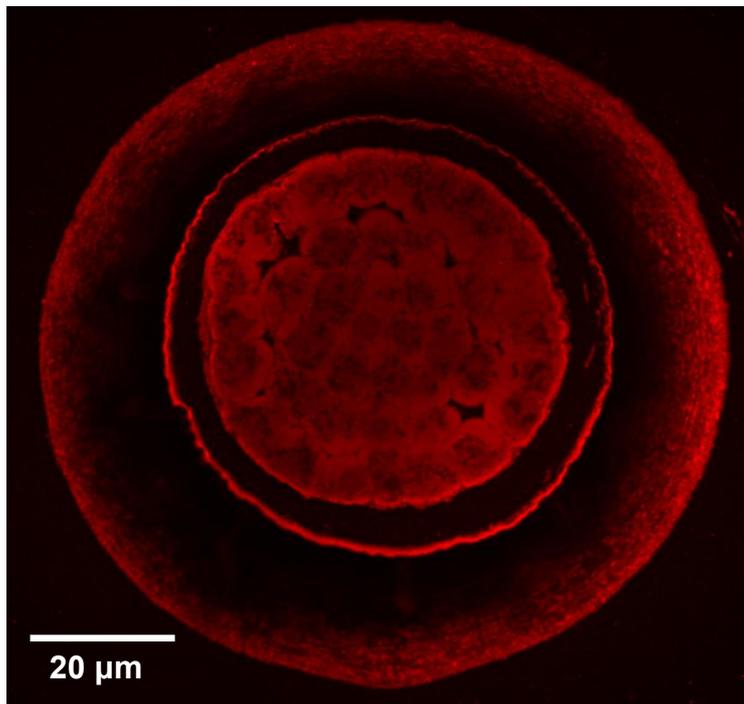


Abbildung 25:
 Leptin-IHC an einer 80h alten frühen Blastozyste. Die Bildung der Blastozystenhöhle beginnt bei diesem Embryo gerade. Einige kleine Kavitäten sind angeschnitten. Das Leptin- Verteilungsmuster entspricht weiterhin dem bereits beschriebenen.

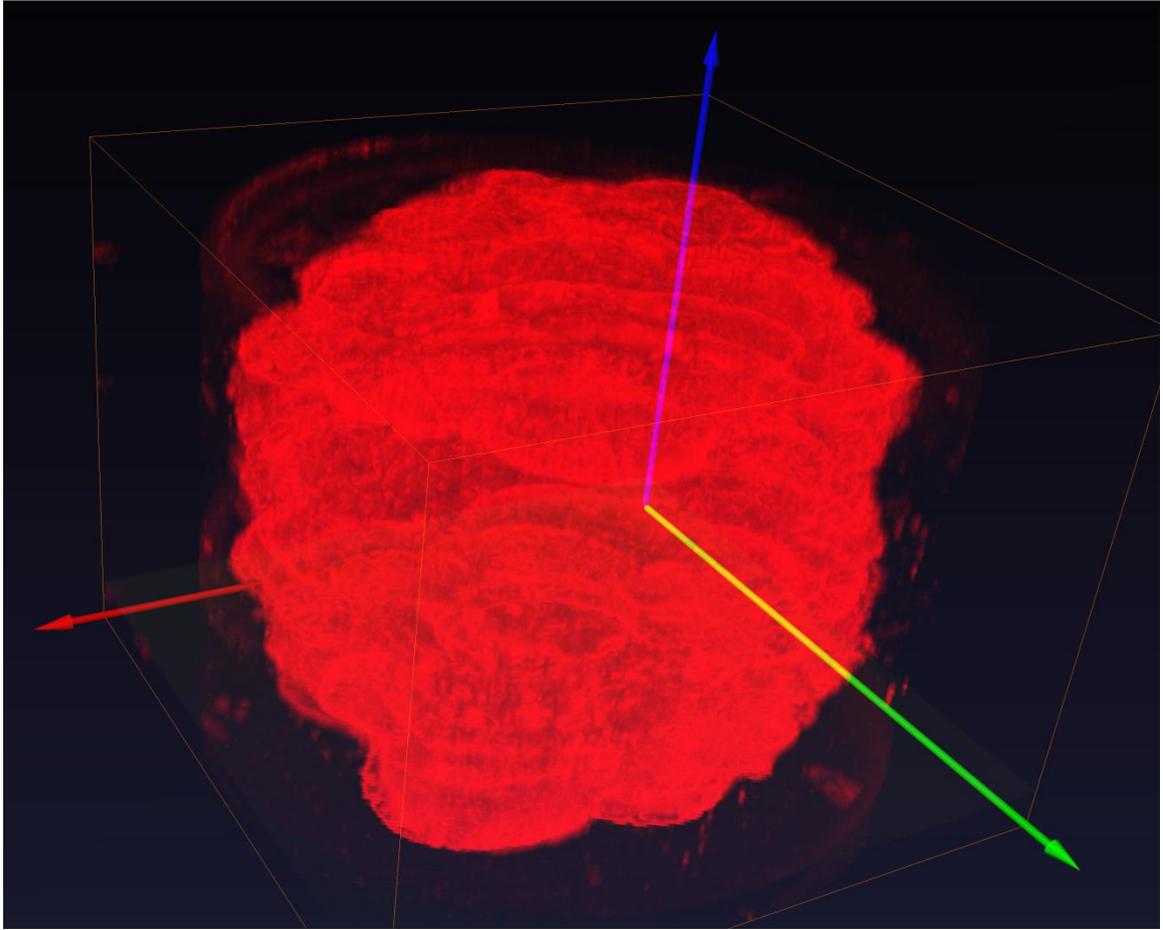


Abbildung 26:

Dreidimensionale Rekonstruktion der histologischen Realschnitte (Leptin-IHC) (Amira Software). Dargestellt ist nur die Gesamtheit der Blastomeren; die Hüllen sind fortgelassen. Eine die Oberfläche umspannende Polarität ist offensichtlich nicht erkennbar.

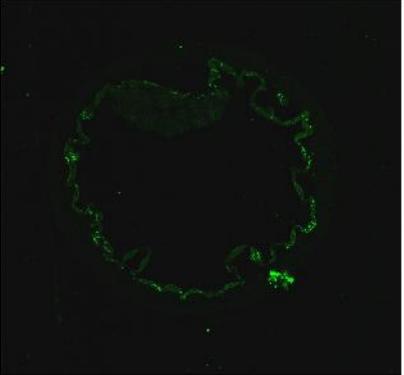
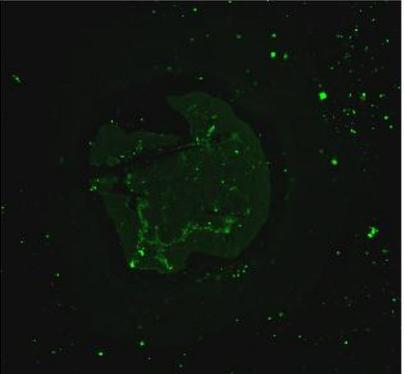
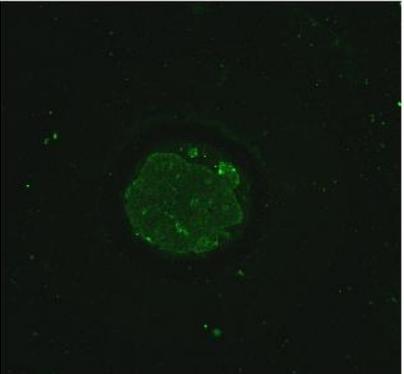
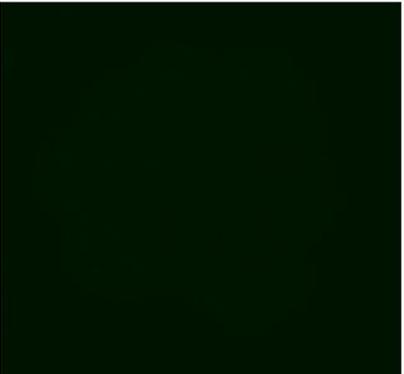
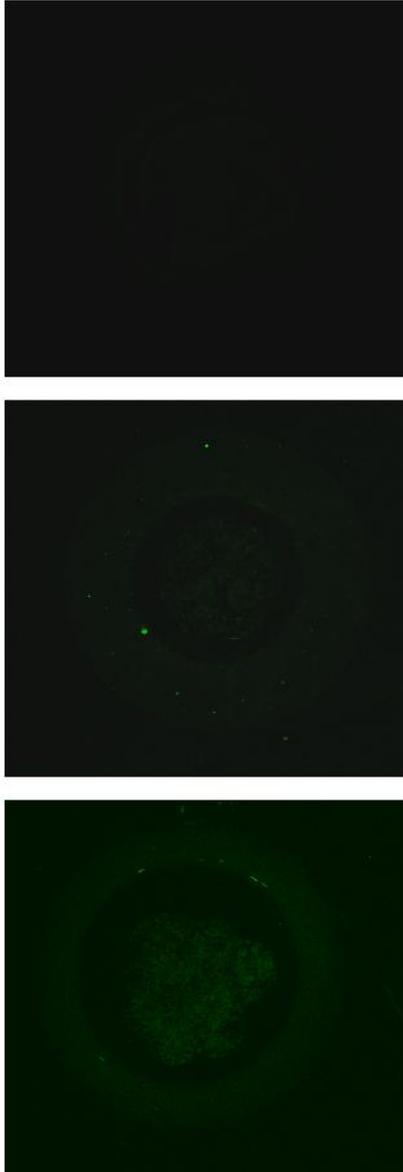
56 h	69 h	80 h	96 h
			
<p>Abbildung 27: Übersicht über die Zytokeratindarstellungen am histologischen Realschnitt. Alle Präparate der oberen Zeile zeigen eine Zytokeratin-IHC an einem Embryo der genannten Entwicklungsstufe. Die untere Abbildung zeigt die jeweils zugehörige Negativkontrolle, bei der statt des aus der Maus stammenden Erstantikörpers mit unspezifischen Maus IgG inkubiert wurde. Die Zytokeratinverteilung im 96h-Stadium kann als typisch gelten: Während die ICM keinerlei Signal zeigt, findet sich im Trophoblasten eine netzartige filamentäre Signalverteilung. Im 56h-Embryo ist kein Zytokeratin nachweisbar. Die dazwischen liegenden frühen Blastozysten zeigen eine Markierung der der Blastozystenhöhle zugewandten oberflächlichen Partien der inneren Blastomeren.</p>			
<p>Abb. 27a: HE-Färbung einer 96h alten Blastozyste mit der sie umgebenden Mukoproteidschicht.</p>			
			

Abbildung 28:
 Schema der
 frühembryonalen
 Achsen. Das
 zweite
 Polkörperchen
 (hellgrün)
 definiert den
 animalen Pol.
 Eine feste
 Lagebeziehung
 der Achsen (im
 Schema
 suggeriert wird
 eine orthogonale
 Lage) ist in der
 wissenschaftlichen Diskussion umstritten (nach Ergebnissen von Gardner 2006a/b;
 Zernicka-Goetz 2004, 2006).

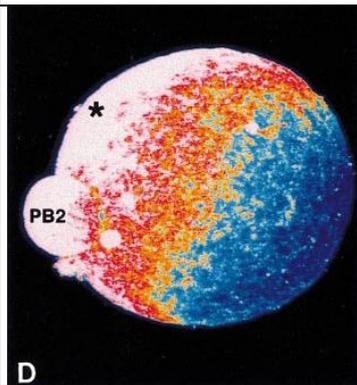
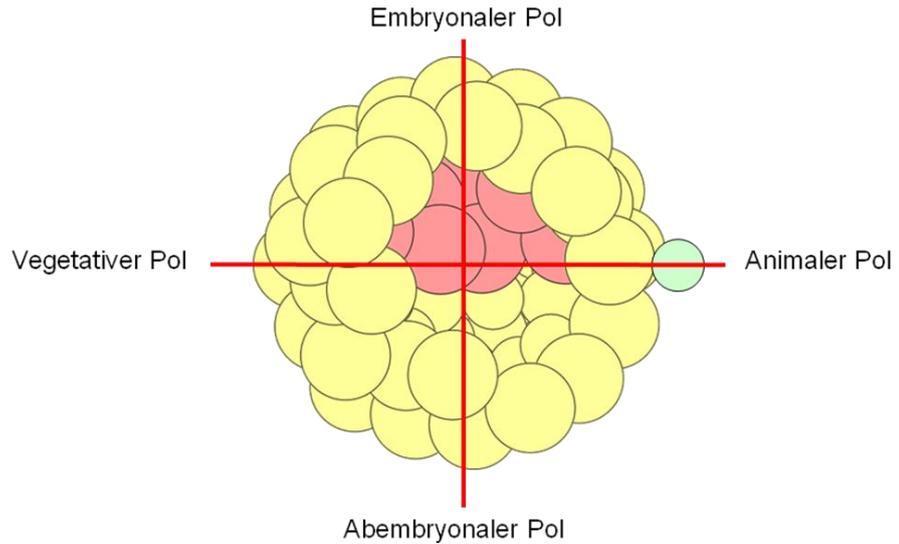


Abbildung 29:
 Leptin-ICH an einer menschlichen Zygote in
 Falschfarbendarstellung, Ganzpräparat, CLSM, 3D-
 Rekonstruktion. Weiß entspricht maximaler, blau
 minimaler Intensität.
 Die leptinreiche Domäne ist zusätzlich durch ein
 Sternchen gekennzeichnet. Man beachte den
 hohen Leptingehalt des 2. Polkörperchens.
 Aus Antczak & Van Blerkom (1997).

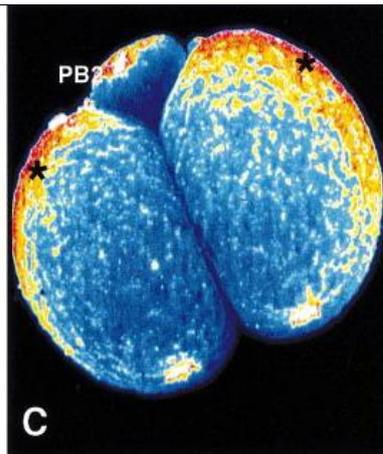
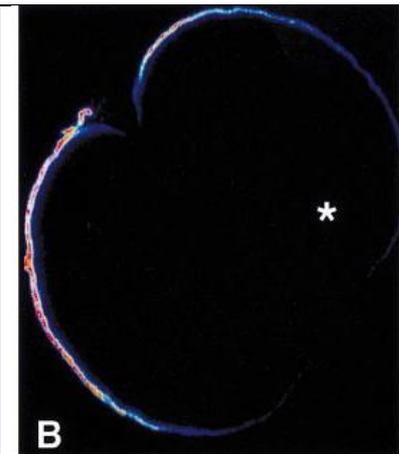


Abbildung 30:
 Leptindarstellung an einem Zweizeller der Maus. Ganzpräparat, CLSM. [B] zeigt einen
 virtuellen optischen Schnitt durch die Mitte des Präparates, [C] die 3D-Rekonstruktion.
 Das zweite Polkörperchen kommt hier in der Furche der Blastomeren zu liegen. Im
 Rahmen der weiteren Furchungen wird die leptinreiche Domäne also auf die
 Blastomeren segregiert. Weißer Stern = leptinarm, schwarzer Stern = leptinreicher Pol
 Aus Antczak & Van Blerkom (1997)

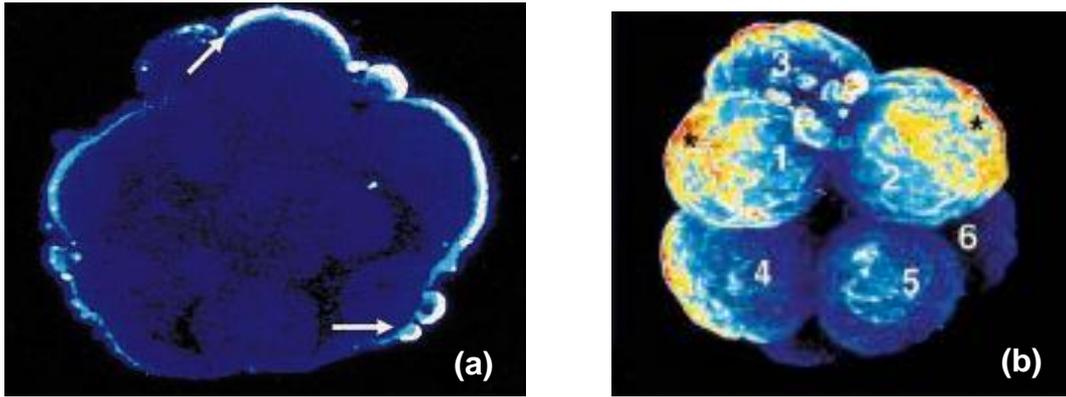


Abbildung 31:

Fröhe menschliche Morula, Ganzpräparat, CLSM, Leptin-Immunochemie. Abbildung (a) zeigt einen virtuellen Schnitt. Die leptinreiche Domäne ist durch zwei Pfeile markiert. Man beachte die prinzipielle Ähnlichkeit im Vergleich mit den in dieser Arbeit beim Kaninchen erhobenen Befunden (Abb. 5,6,7,11,12). Die 3D-Rekonstruktion eines vergleichbaren Embryos zeigt die fast eine Hemisphäre der Morula einnehmende leptinreiche Domäne (schwarze Sternchen). Die Zahlen nummerieren die Blastomeren. Vergleiche Abb. 6 zur Ähnlichkeit der Leptin-Immunochemie bei der Kaninchenmorula. Aus Antczak & Van Blerkom (1997)

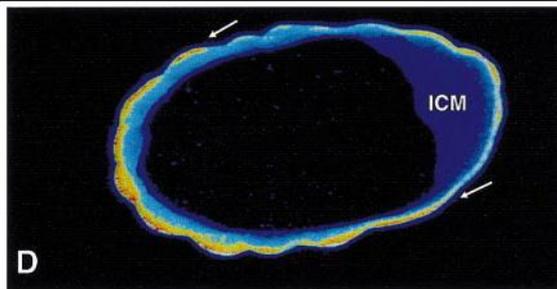


Abbildung 32:

Menschliche Blastozyste in Leptin-IHC. Während die ICM kein Signal enthält, liegt die leptinreiche Domäne jetzt im muralen und abembryonalen Trophoblasten. Aus Antczak & Van Blerkom (1997)

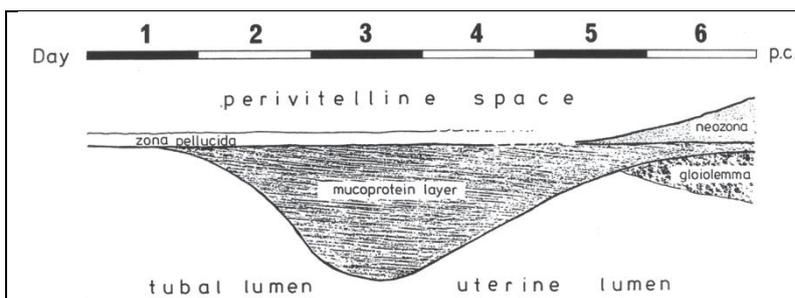


Abbildung 33:

Entwicklung der embryonalen Hüllen beim Kaninchen in den ersten sechs Tagen p.c. Aus Denker (2000)

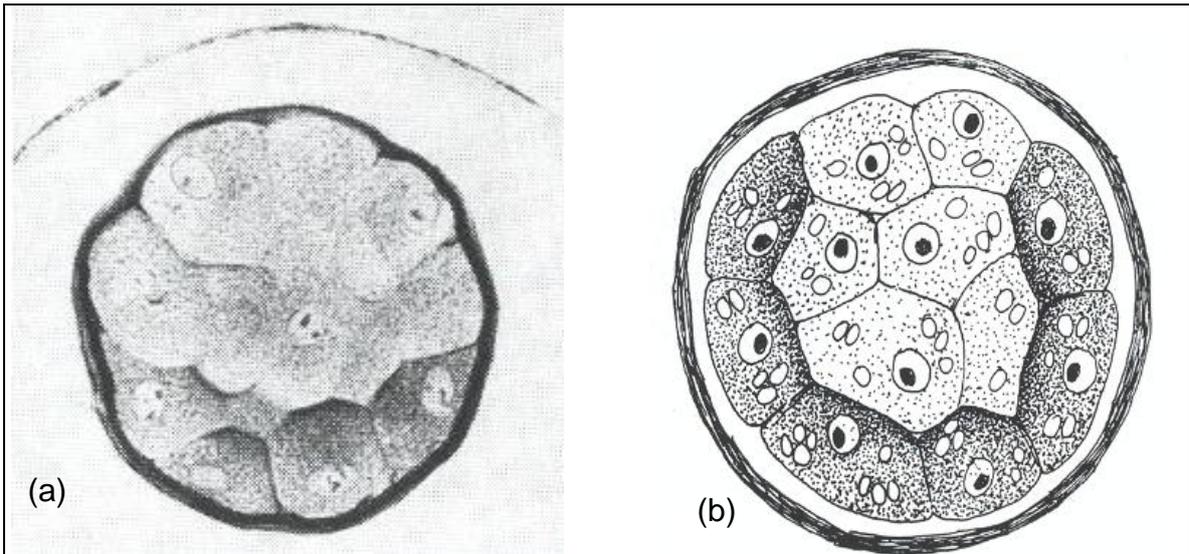


Abbildung 34:
 Kaninchenmorula (a) 63h p.c. nach Fixierung mit Formol-Alkohol-Eisessig, Paraffinschnitt, HgBPB-Färbung. Schema (b) entsprechender Befunde von der Katze. Dreidimensional liegt die Form einer Tasse vor, d.h. die äußeren Zellen der Morula zeigen an einem Pol (oben) ein abweichendes, den inneren Zellen entsprechendes, Färbeverhalten.
 Aus Denker (1972) und Denker et al. (1978)

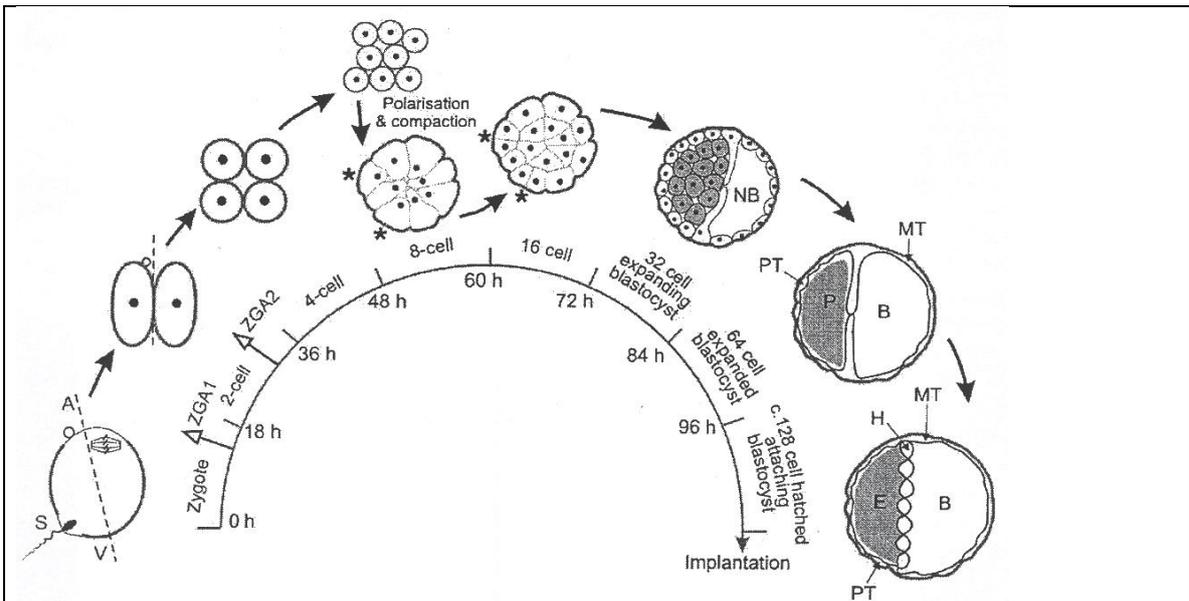


Abbildung 35:
 Schema zur Polarisationshypothese: Durch differentielle Zellteilung entstehen apolare innere und polare äußere Blastomeren. Letztere bilden das erste Epithel in der Ontogenese, den Trophoblasten. Aus Johnson und McConnell (2004)
 Vgl. aber Abb. 34 zu Befunden, dass die polaren Blastomeren nur an einem Teil der Morula-Oberfläche zu finden sind, dem späteren Abembryonalpol.

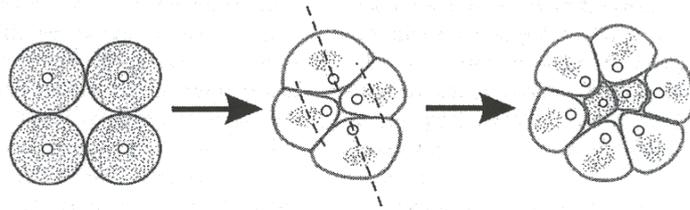


Abbildung 36:
 Schema zur Entstehung der zwei Zelltypen, ICM=Embryoblast und Trophoblast, durch differentielle Zellteilung.
 Aus Johnson und McConnell (2004)

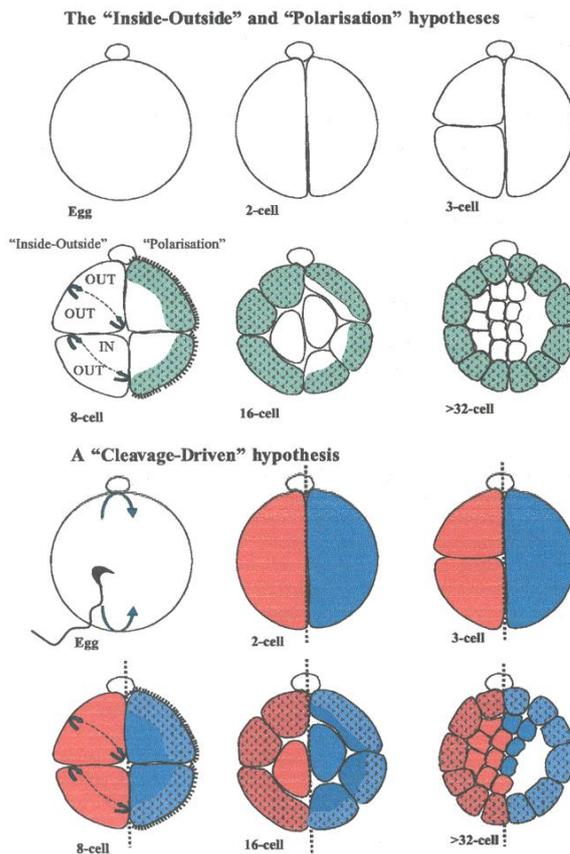


Abbildung 37:
 Darstellung von Innen-Außen-, Polarisations- und „Cleavage-driven-Hypothese“ nach Zernicka-Goetz:
 Die ½-Blastomere, die den SEP enthält (rot) teilt sich zuerst erneut, behält einen zeitlichen Vorsprung und steuert mehrheitlich die Zellen des Embryoblasten bei. Die „clonal border“, rot-blau-Grenze, verläuft gegen die Senkrechte auf der Emb-Ab-Achse leicht verkippt.
 Aus Zernicka-Goetz (2002)

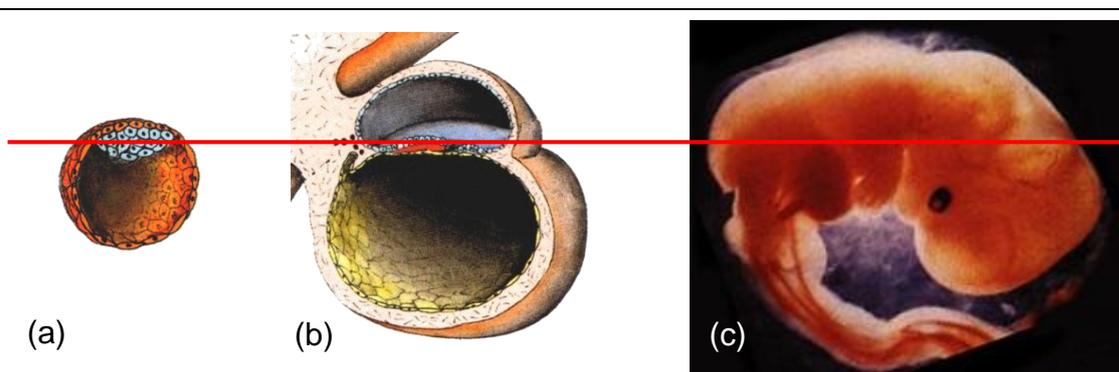


Abbildung 38:
 Schema zur Verdeutlichung der Entwicklung frühembryonaler Achsen:
 Die präimplantative Blastozyste (a) gibt bereits die Orientierung der späteren Dorso-Ventral-Achse vor, da diese der Embryonal-Abembryonal-Achse entspricht.
 (a) und (b) aus Rohen (2002)
 (c) aus http://www.8ung.at/schwanger-was-nun/hauptteil_embryo.html

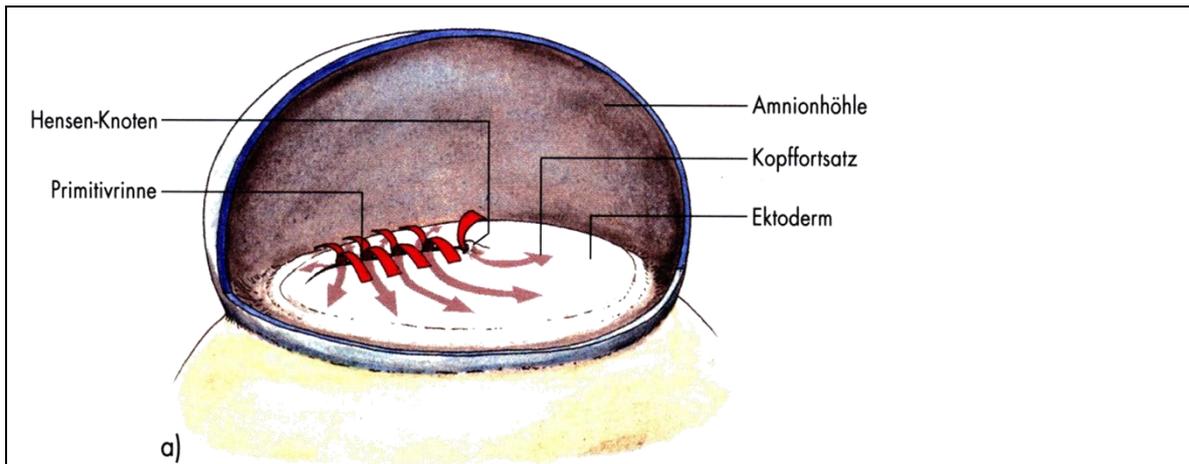


Abbildung 39:

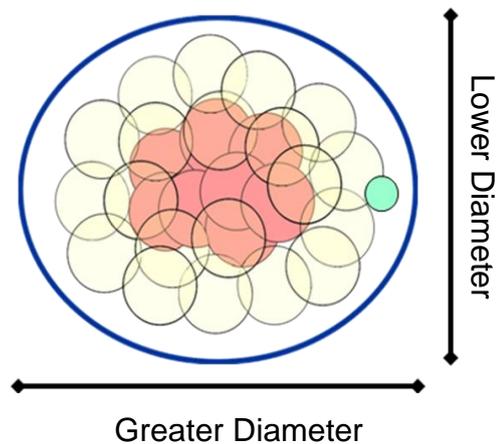
Die flache (im Bild weiße) Keimscheibe mit beginnender Gastrulation in der Aufsicht zeigt, dass neben der Dorso-Ventralen-Achse (vgl. Abb. 38) jetzt durch die exzentrische Lage der Primitivrinne eine weitere Achse gegeben ist. Spätestens ab diesem Zeitpunkt ist damit die Kranio-Kaudal-Achse definiert. Die Abbildung zeigt nur andeutungsweise, dass die Keimscheibe in diesem Stadium auch nicht mehr kreisrund sondern birnenförmig (schmalerer Teil im Bild links) ist.

Quelle: Rohen (2002)

Abbildung 40:

Gardners Beobachtung, dass die Blastozyste nicht, wie bisher angenommen kreisrund, sondern vielmehr längsoval ist. In rot ist die ICM dargestellt, die übrigen gelb-durchsichtig gezeichneten Blastomeren stellen Trophoblastzellen dar. In hellgrün das zweite Polkörperchen, dunkelblau die Zona pellucida. Die Perspektive zeigt den Embryo vom embryonalen Pol her, d.h. die Emb-Ab-Achse läuft senkrecht durch den Embryo auf den Betrachter zu.

Nach Befunden von Gardner (1997).



Lower Diameter

Greater Diameter

7.2 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Langform
a.d.	Aqua destillata
A-V-Achse	Animal-vegetative-Achse
BSA	Bovines Serumalbumin
CLSM	Confokale Laserscanning Mikroskopie
D-V-Achse	Dorso-ventrale-Achse
EGF, EGF-R	Epidermal growth factor, -receptor
Emb-Ab-Achse	Embryonal-Abembryonal-Achse
EPI	Epiblast
FT	Furchungsteilung
HB-EGF	Heparin-binding epidermal growth factor
Hepes	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
GD	Greater diameter / größerer Blastozystendurchmesser
ICM	Innere Zellmasse
IGF	Insulin-like growth factor
IHC	Immunhistochemie
ISH	In-situ-Hybridisierung
LD	Lower diameter / kleinerer Blastozystendurchmesser
OB, OB-R	Obese-gene, -receptor; = Leptin, -Rezeptor
Pb	Polar body / Polkörperchen
PBS	Phosphat buffered salt solution
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PE	Primitive Endoderm
PVS	Perivitelliner Spalt
RT	Raumtemperatur
SEP	Sperm-entry-point / Spermienpenetrationsstelle
Stat3	Signal transducer and activator of transcription 3
Stunden p.c.	Stunden post conceptionem (nach der Befruchtung)
TB	Trophoblast
TE	Trophoektoderm
TGF β 2	Transforming growth factor β 2
TRITC	Tetramethyl-Rhodamin-Iso-Thiocyanat
VEGF	Vascular endothelial growth factor
ZP	Zona pellucida

7.3 Chemikalienverzeichnis

Substanz	Lieferant	Katalognr.
Aceton	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	00585
Aktin-Phalloidin-TRITC	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	P1951
BSA (Bovines Serumalbumin)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	A9418
Calciumchlorid-Dihydrat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	21102
DAB (3',3'-Diamino-Benzidin-tetrahydrochlorid)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	D5905
DMP-30	Polysciences	00553
Dodeceny succinylsäureanhydrid	Polysciences	00566
EGTA Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetyl-Säure (Extraktionspuffer)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	03780

Ethanol reinst	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	02865
Glucose-Monohydrat	Merck	1.04074.1000
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	03897
Hepes	Biochrom	L1603
Igepal	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	I-3021
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	60130
Kaliumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	60230
Ketaminhydrochlorid 10%	Sanofi-Ceva	36219/02
Leptin (rekombinantes humanes)	Acris	PA094X
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	63065
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	63142
Mowiol 4-88	Calbiochem	475904
Nadic Methylanhydrid	Polysciences	00886
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	71380
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	71638
Natrium-Hepes	Serva, Heidelberg	25249
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	71691
PAP-Pen	Immunotach	PN IM3580
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	76240
PBS	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	P3813
PolyBed 812	Polysciences	08791
Pronase E	Serva, Heidelberg	33635.01
Proteinase K	Roche Applied Science Mannheim	161519
RapidFix	Ilford	
Silane (3-Triethoxysilyl-propylamin)	Merck	8.21649.0100
Tris-HCl-Puffer	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	28531
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	234729
Xylazinhydrochlorid 2%	Sanofi-Ceva	48476/03
Erstantikörper		
Maus-Anti-Pan-Zytokeratin-Antikörper	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	C2562
Schaf-anti-human-Leptin-Antikörper	Acris	BP585
Schaf-anti-human-Leptin-Antikörper	Abcam	S270
Zweitantikörper		
Alexa 488 Esel-anti-Schaf	Molecular Probes	A-21098
Alexa 488 Ziege-anti-Maus	Molecular Probes	A-11015
Gold-konjugierter Ziege-anti-Maus-Zweitantikörper) (6nm)	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc	115-195-146
HRP-konjugierter Ziege-anti-Maus-Zweitantikörper	Dako Glostrup, Denmark	P0447
Zusammenstzung des Hepes-Ausspülmediums		
223 mg/l NaCl; 1,3 mg/l CaCl ₂ * 2H ₂ O; 4 mg/l KCl; 2,5 mg/l MgSO ₄ * 7H ₂ O; 7,6 mg/l KH ₂ PO ₄ ; 2,38 g/l Hepes; 2,6 g/l Na-Hepes; 0,99 g/l Glucose Monohydrat		

7.4 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. A. Herrler sehr herzlich für die Tipps zum kombiniert enzymatisch-mechanischen Abdau der Embryonalhüllen, ferner Herrn Dr. A. Schleicher (Forschungszentrum Jülich) für die Möglichkeit der Nutzung der Amira-Software zur 3D-Rekonstruktion.

Ich danke auch den Mitarbeitern des Zentralen Tierlaboratoriums am Uniklinikum Essen und hier besonders Herrn Priv.-Doz. Dr. G. Hilken für die zuverlässige Betreuung der Kaninchen einschließlich des zeitgerechten Belegens.

Besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Anatomie und Entwicklungsbiologie des Instituts für Anatomie der Universität Duisburg-Essen. Hier ist Frau Dorothea Schünke besonders zu erwähnen, die mit ihrer reichhaltigen Erfahrung bei der Einbettung und beim Schneiden der Embryonen unverzichtbare Hilfestellung gegeben hat.

Zuletzt danke ich meinem Doktorvater, Herrn Univ.-Prof. Dr. H.-W. Denker, für die langjährige intensive und persönliche Betreuung, seinen steten Rat und die praktische Hilfe bei der Gewinnung der Embryonen.

8. Lebenslauf

Name	Timm Littwin
Geburtsdatum	22. Oktober 1978
Geburtsort	Gelsenkirchen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet
Wohnort	Erlangen

Ausbildung:

08/1985 bis 06/1989	Grundschule am Haidekamp, Gelsenkirchen
08/1989 bis 06/1998	Schalken Gymnasium, Gelsenkirchen
Schulabschluss	Abitur im Juni 1998
10/1998-05/2005	Studium der Humanmedizin an der Universität Duisburg-Essen
05/2005	Approbation

Berufstätigkeit:

Seit 07/2005	Assistenzarzt an der Chirurgischen Universitätsklinik Erlangen
--------------	---